

Aus der Frauenklinik Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. Lax

Präparation und Anwendung spezifischer Antiseren
zur radioimmunologischen Bestimmung
von LH, FSH und HCG

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karin Schmidt-Gollwitzer

aus Gosen

1976

Referent: Professor Dr. med. J. Nevinny-Stickel

Korreferent: Professor Dr. med. H.J. Quabbe



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22.9.1976

INHALTSÜBERSICHT

Seite

A EINLEITUNG

I. Allgemeiner Überblick	1
II. Struktur der Proteohormone	4
III. Probleme der Spezifität	5
IV. Immunisation mit Beta-Untereinheiten	7

B MATERIAL UND METHODEN

I. Hormonpräparationen	9
II. Immunisationstechnik	9
III. Radiojodination der Hormone	10
IV. Prüfung der Antikörpertiter und der Kreuzreaktionen	12
V. Durchführung der Immunoabsorption	13
VI. Prüfung der Sensitivität und Spezifität	15
VII. Radioimmunoassay	16
VIII. Untersuchungsmaterial	17

C ERGEBNISSE

I. Antiserenmengen	18
II. HCG-beta-Antiseren	19
1. Antikörpertiter	19
2. Spezifität	19
a) Vergleich mit dem HCG-beta-Antiserum (Cr 100 β)	
b) Vergleich mit den HCG-alpha-Antiseren	
3. Inhibitionsstudien	21
4. Immunoabsorptionen	22
a) mit nativen Hormonen	
b) mit HCG-alpha	

	Seite
III. FSH-beta-Antiseren	26
1. Antikörpertiter	26
2. Spezifität	26
3. Inhibitionsstudien	27
4. Immunoabsorptionen	28
a) mit nativen Hormonen	
b) mit HCG-alpha	
IV. LH-beta-Antiseren	30
1. Antikörpertiter	30
2. Spezifität	30
3. Inhibitionsstudien	31
4. Immunoabsorptionen	31
V. Anwendung der spezifischen Antiseren	33
1. Anwendung der LH-beta-Antiseren im Radioimmunoassay	
2. Anwendung der FSH-beta-Antiseren im Radioimmunoassay	
3. Anwendung der HCG-beta-Antiseren im Radioimmunoassay	
VI. Klinische Untersuchungen	35
1. LH- und FSH-Serumkonzentrationen	
2. HCG-Serumkonzentrationen	
D DISKUSSION	37
E ZUSAMMENFASSUNG	43
F LITERATURVERZEICHNIS	45
G GRAPHISCHE DARSTELLUNGEN	57
H LEBENS LAUF	75

EINLEITUNG

I. Allgemeiner Überblick

Die von BERSON und YALOW eingeführte radioimmunologische Meßmethode ermöglicht den Nachweis geringster Hormonmengen in Körperflüssigkeiten (1, 2). Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Reaktion zwischen einer begrenzten Menge von radioaktivmarkiertem Antigen (Tracer) und dem entsprechenden Antikörper sowie der kompetitiven Hemmung dieser Bindung durch nichtmarkiertes Antigen. Nach Trennung des freien Tracers vom Reaktionskomplex Tracer-Antikörper und der radiologischen Messung eines dieser Anteile kann quantitativ die Menge des im Serum vorhandenen Antigens (Hormon) durch Vergleich mit einer Standardpräparation bestimmt werden. Dieses Prinzip - erstmals für die Insulinbestimmung angewendet - wurde bald auf die Messung der Glykoproteohormone ausgedehnt (3, 4 , 5 , 6 , 7).

Um diese immunologische Meßtechnik für experimentelle und klinische Studien einsetzen zu können, sind die von BORTH 1952 allgemein für alle Arten der Hormonbestimmung aufgestellten Kriterien, wie Spezifität, Genauigkeit, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Meßsysteme zu prüfen (8). Insbesondere die geforderte Spezifität stellt für die radioimmunologische Bestimmung der Glykoproteohormone : luteinisierendes Hormon (LH), Follikel-stimulierendes Hormon (FSH), Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH) und

Choriongonadotropin (HCG) ein wesentliches Problem dar, da die Entwicklung spezifischer Antikörper wegen der nahen strukturellen und damit antigenen Verwandtschaft innerhalb dieser Hormongruppe Schwierigkeiten bereitet (9, 10, 11). So führt die Immunisierung mit einem dieser Hormone häufig zu einem Antiserum, das gemeinsame antigene Determinanten aller vier Hormone erkennt und sie zu binden vermag (12, 13, 14). Der selektive Nachweis eines dieser Hormone in Gegenwart der anderen Glykoproteohormone wird dadurch erschwert. Die geforderte Spezifität hängt allerdings auch vom Untersuchungszweck ab. So ist beispielsweise zum Nachweis der großen Mengen an HCG (mehrere 1000 ng/ml) während der Schwangerschaft die Kreuzreaktion des verwendeten HCG-Antiserums mit LH und FSH unerheblich, da LH und FSH nur im Bereich von 1 bis 5 ng/ml im Serum vorhanden sind. Die Messung von LH im Menstruationszyklus wird durch ein mit HCG kreuzreagierendes Antiserum nicht beeinflusst, wohl aber, wenn eine Kreuzreaktion mit FSH vorliegt. Andererseits muß für ein HCG-Antiserum, das zur Bestimmung geringer HCG-Quantitäten (die im Bereich physiologischer FSH- und LH-Spiegel liegen) eingesetzt werden soll, eine hohe Spezifität gefordert werden, um z.B. eine Schwangerschaft zum frühestmöglichen Termin nachweisen zu können oder um die ektope Produktion von HCG von Karzinomen zu erfassen (15).

Zur Lösung des Problems der Spezifität der Antiseren wurden in den letzten Jahren verschiedene Wege beschritten.

So konnte durch Modifikation der Immunisationstechnik, durch eine große Anzahl von Immunisationstieren, durch verschiedene Reinigungsprozeduren der Antisera und der Immunogene wie Immunoabsorption, Affinitätschromatographie, brauchbare spezifische Antisera für die radioimmunologische Meßtechnik entwickelt werden (16, 17, 18, 19, 20). Insbesondere die Isolierung und Purifikation sowie die Aufklärung der Struktur der Glykoproteohormone konnte zur Klärung der immunologischen Kreuzreaktionen beitragen. Die Glykoproteohormone bestehen aus zwei nicht identischen Untereinheiten, in die sie durch geeignete chemische Verfahren dissoziieren können (21, 22, 23). Die sogenannte Alpha-Untereinheit hat in den humanen Glykoproteohormonen eine ähnliche Struktur, wirkt antigen und führt so zu den im Radioimmunoassay nachweisbaren Kreuzreaktionen (24). Die Beta-Untereinheit soll dagegen in ihrer Struktur spezifisch für jedes Hormon sein (21, 25, 26).

Nachdem Untereinheiten zur Verfügung standen, konnte die von VAITUKAITIS et al vorgeschlagene Immunisierung mit BETA-Untereinheiten zur Umgehung kompletter Kreuzreaktionen durchgeführt werden (16). Im Labor von Dr. SAXENA, New York, verwendeten wir Beta-Untereinheiten von LH, FSH und HCG sowie Alpha-Untereinheiten von HCG zur Immunisierung und prüften die Spezifität der entwickelten Antisera und deren Verwendbarkeit zu radioimmunologischen Messungen. Durch Immunoabsorptionen versuchten wir kreuzreagierende Antisera von kontaminierenden Antikörpern zu befreien, um sie damit in ihrer Spezifität zu erhöhen.

II. Struktur der Proteohormone

LH und FSH können aus Hypophysengewebe extrahiert und durch verschiedene chemische Reinigungsprozeduren von kontaminierenden Substanzen befreit werden. HCG, dem luteinisierenden Hormon ähnlich, wird von den Langhans'schen Zellen der Plazenta sezerniert und kann aus Plazenta, aus dem Serum und dem Urin schwangerer Frauen extrahiert werden.

Durch die Isolierung und Purifikation von LH (27, 28, 29), FSH (30, 31, 32) und HCG (33, 34, 35) konnte die chemische Struktur dieser Hormone aufgeklärt werden. Chemisch sind die Glykoproteohormone Polymere, in denen der Polysaccharidanteil kovalent mit den Polypeptidgruppen verbunden ist (36). Die unterschiedlichen Molekulargewichte von LH (26.750), FSH (31.000) und HCG (41.000) sind vor allem durch verschiedene Mengen an Karbohydraten bedingt (36, 37). Unter geeigneten Bedingungen kann jedes dieser Hormone in zwei nicht identische Anteile zerlegt werden (21, 22, 23, 38, 39). Diese Untereinheiten werden als Alpha- und Beta-Subunits bezeichnet und sind nicht kovalent miteinander verbunden.

Die Aminosäuresequenzen der Alpha- und der Beta-Untereinheiten jedes Hormones sind nicht identisch (26, 40, 41). Die Alpha-Untereinheiten von LH, FSH, TSH und HCG weisen in ihrer Struktur erhebliche Analogien auf, z.B. im Gehalt und der Anordnung bestimmter Aminosäuren (38, 42, 43).

Die Beta-Untereinheiten dagegen haben zwar auch gemeinsame Kennzeichen, differieren aber stark im Detail der Aminosäuresequenz und insbesondere im Bereich der carboxyterminalen Struktur, die für jedes Hormon spezifisch sein soll (44).

Innerhalb der Glykoproteohormongruppe einer Spezies sind die Alpha-Untereinheiten austauschbar, d.h. das neu zusammengefügte Hormon aus der Beta-Untereinheit und der Alpha-Untereinheit eines anderen Hormones besitzt die gleiche biologische Aktivität wie das ursprüngliche Hormon (45, 46). Damit ist nachgewiesen, daß die Alpha-Untereinheiten nicht spezifisch für eines der Hormone aus dieser Gruppe sind. Dagegen kommt es durch den Austausch der Beta-Untereinheit bei der Rekombination mit der Alpha-Einheit eines Glykoproteohormones zum Verlust der biologischen Aktivität, d.h. die biologische Wirkung des Hormones, aus dem die Alpha-Untereinheit stammt, geht verloren (35, 38).

III. Probleme der Spezifität

Die Erzeugung spezifischer Antiseren durch Verwendung von nativem Hormon als Antigen ist, wie es REICHERT ausdrückt, eine "Übung in Geduld und Glück" (47). Da sowohl Teile der Alpha- als auch der Beta-Untereinheit antigen determinant wirken, werden durch die Immunisierung mit intaktem Hormon meist Antiseren erzeugt, die in ihrem Bindungsvermögen zum entsprechenden Antigen durch die anderen Glykoproteohormone

beeinflusst werden können. Trotz großer Anzahl an Immunisierungstieren und hohem Materialaufwand können aufgrund der gemeinsamen Alpha-Untereinheit häufig nicht die geeigneten Antiseren erzeugt werden. So immunisierte ODELL 30 Kaninchen mit FSH; die gewonnenen Antiseren waren alle unspezifisch. Nur ein Antiserum konnte er durch Immunabsorption in seiner Spezifität erhöhen (48). SCHLAFF et al konnten zeigen, daß 90% des Antiserums, das gegen natives FSH entwickelt wurde, keine Antikörper enthielt, die speziell gegen antigene Determinanten von FSH gerichtet waren, aber Antikörper gegen Determinanten vorhanden waren, die allen Glykoproteohormonen gemeinsam sind (14). Ähnliche Schwierigkeiten bestehen bei der Entwicklung von spezifischen HCG- und LH-Antiseren. FRANCHIMONT fand unter 43 HCG-Antiseren nur ein Antiserum, das zwischen LH und HCG diskriminierte (10).

Die Vielzahl gemeinsamer antigener Determinanten führte aber auch dazu, daß nicht entsprechende Antigen-Antikörperkonstellationen im Radioimmunoassaysystem verwendet werden. So wird z.B. für die Bestimmung von LH häufig HCG-Antiserum eingesetzt (3, 6, 49, 50). Fast alle HCG-Antiseren haben komplette Kreuzreaktionen mit LH und können daher zum Nachweis von LH verwendet werden. Als weitere Möglichkeit, die Kreuzreaktionen zu umgehen, führt MIDGLEY die Hormonbestimmung mit einem heterologen Radioimmunoassaysystem durch (51, 52).

Zur Neutralisation unspezifischer Antikörperanteile wird von mehreren Autoren die Immunabsorption mit dem kreuzreagierenden Hormon vorgeschlagen (4, 5, 6, 7, 53, 54). So kann ein Anti-FSH-Serum mit Kreuzreaktionen zu HCG und LH durch die Absorption mit HCG in seiner Spezifität erhöht werden. Dabei soll nach FRANCHIMONT allerdings nur soviel Absorbens eingesetzt werden, daß die Bindungskapazität dieses Antiserums bei maximaler Reduktion der Kreuzreaktionen erhalten bleibt (9, 55). Voraussetzung zur Eliminierung unerwünschter Antikörperpopulationen ist, daß eine signifikante Bindungspotenz des Antikörpers mit dem primären Antigen vorhanden ist, d.h. daß komplette Kreuzreaktionen schwieriger als inkomplette Kreuzreaktionen auszuschalten sind (56). Der Nachteil dieser Methode ist jedoch meist ein Verlust der Sensitivität im Radioimmunoassaysystem. Eine Modifikation der Immunabsorption beschreibt ODELL, der die Kreuzreaktionen in einem TSH-Radioimmunoassay durch Zugabe von HCG zu jedem Reagenzglas reduziert, ohne daß ein nennenswerter Titerverlust des Antiserums auftritt (57).

IV. Immunisation mit Beta-Untereinheiten

Die strukturellen Gegebenheiten für die immunologische Aktivität der Glykoproteohormone sind von denen verschieden, die für die biologische Wirkung verantwortlich sind (58, 59). Wenn es gelingt, die Immunoreaktivität mit dem biologischen aktiven Protein zu korrelieren, ist es nicht notwendig, Antigene zur

Entwicklung von Antiseren zu verwenden, die selbst biologisch aktiv sind (47). Die Alpha- und Beta-Untereinheiten haben im Bioassay nur eine geringe biologische Aktivität, wirken aber antigen (24, 60). Es erscheint daher sinnvoll, den Anteil des Glykoproteohormones zur Immunisation zu verwenden, der alleinig in diesem Hormon vorkommt, um damit wahrscheinlich spezifischere Antiseren zu erhalten. VAITUKAITIS et al haben erstmals die Immunisation mit HCG-Beta durchgeführt (16, 24). Mit wenigen Immunisationstieren konnten sie Antiseren erhalten, die meist nur geringe inkomplette Kreuzreaktionen aufwiesen. Bei Verwendung von Alpha-Untereinheiten dagegen als Immunogen kam es, wie häufig bei Immunisation mit nativen Hormonen, zu Antiseren, die komplett kreuzreagierten. Die auch bei Beta-Antiseren gesehene Kreuzreaktivität ist nach CATT et al in der Hauptsache auf eine Kontamination der Untereinheiten mit intaktem Hormon bzw. Alpha-Untereinheiten zurückzuführen (60).

3 MATERIAL UND METHODEN

I. Hormonpräparationen

LH und LH-Beta sowie FSH und FSH-Beta mit hoher physiko-chemischer Reinheit wurden von in Azeton gelagerten menschlichen Hypophysen, die von der "National Pituitary Agency", Baltimore, Maryland, U.S.A., gegeben wurden, durch Dres. SAXENA und RATHNAM hergestellt und großzügigerweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (28, 30, 38). HCG, HCG-Alpha und HCG-Beta wurden uns freundlicherweise von Dr. O.P. BAHL (State University of New York at Buffalo, N.Y.) und Dr. R.E. CANFIELD (University of Physicians and Surgeons, New York, N.Y.) überlassen (34, 23). LH-Beta, FSH-Beta, HCG-Alpha und HCG-Beta wurden zur Immunisierung, natives LH, FSH und HCG zur radioaktiven Markierung mit Jod-125, als Immunoabsorbentien und als Standardpräparationen benutzt.

Die biologische Aktivität der verwendeten Hormone betrug für

1 mg LH etwa 5300 IU / 2.IRP-HMG

1 mg FSH etwa 5600 IU / 2.IRP-HMG

1 mg HCG etwa 12000 IU / 2.IRP-HCG.

II. Immunisationstechnik

16 Neuseeland-Kaninchen mit einem Gewicht von 2 bis 4 kg wurden mit einer Immunisationstechnik nach VAITUKAITIS et al, modifiziert nach SAXENA, mit gereinigten Beta-Untereinheiten von humanem LH und FSH sowie mit HCG-Alpha und HCG-Beta

immunisiert (16). 0.1 mg Antigen, gelöst in 0.5 ml 0.9%iger Na-Cl-Lösung und 0.5 ml vollständigem Freund's Adjuvant (Difco, Detroit, U.S.A.) wurden in Aliquots von 0.1 ml an zehn verschiedenen Stellen der gescherten Rückenpartie und der Läufe intradermal injiziert. Der initialen Immunisation folgten nach 3 Wochen in wöchentlichen Abständen Booster-Injektionen in gleicher Applikationsweise mit Dosen von 0.1 mg Antigen. Die Blutentnahmen erfolgten aus der zentralen Ohrvene. Das gewonnene Blut wurde zentrifugiert und das Serum bei minus 20° Celsius bis zur Untersuchung gelagert.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Seren der 8. Woche nach Erstimmunisation verwendet.

III. Radiojodination der Hormone

Die Radiojodination von LH, FSH und HCG wurde modifiziert nach der Methode von GREENWOOD und HUNTER mit Chloramine-T vorgenommen (61). Von den lyophilisierten Hormonen wurden Stocklösungen mit 0.05 molarem Phosphatpuffer (pH = 7.5) hergestellt, so daß in 20 μ l 2 μ g Hormon enthalten sind.

Zu 20 μ l Aliquote der entsprechenden Hormone (2 μ g Hormon) wurden 20 μ l 0.5 molarer Phosphatpuffer (pH = 7.5), 2 mCi Jod-125 (Cambridge Nuclear, Cambridge, Mass., U.S.A.) und 70 μ g Chloramine-T, gelöst in 20 μ l 0.05 molarem Phosphatpuffer, hinzugefügt und gemischt. Nach 30 bis 45 Sekunden wurde die

Reaktion durch Zugabe von $160\text{ }\mu\text{g}$ Natriumdisulfit, gelöst in $75\text{ }\mu\text{l}$ 0.05 molarem Phosphatpuffer, beendet. 100 mg Iobeads (Hycel-Reagent., Houston, Texas, U.S.A.) fügten wir dem Reaktionsgemisch hinzu, um nichtreagierendes Jod- 125 abzufangen.

Die Trennung von freiem und an das Hormon gebundenem radioaktivem Jod erfolgte durch Adsorptionschromatografie mit Cellulose CF-11 (62). Eine 5 ml Plastikspritze füllten wir zur Hälfte mit Cellulose CF-11. Auf das trockene Cellulosebett wurde das Reaktionsgemisch gegeben. Das freie Jod wurde mit 60 bis 100 ml 0.05 molarem Phosphatpuffer in 10 ml Fraktionen eluiert. Die höchste freie Radioaktivität fand sich meist in der ersten Fraktion. Das radiojodinierte Hormon wurde mit jeweils 1 ml einer Lösung von 20% Azeton, 5% humanem Serumalbumin in 0.05 molarem Phosphatpuffer aus der Cellulose herausgewaschen. Die radioaktivmarkierten Hormone konnten meist in der $3.$ bis $4.$ Fraktion aufgefangen werden und wurden mit 4 ml 0.05 molarem Phosphatpuffer, der 0.1% humanes Serumalbumin enthielt, verdünnt. Das Antikörperbindungsvermögen der Fraktionen des Proteingipfels prüften wir durch Zugabe von Antikörper im Überschuß. Die Tracer wurden innerhalb von drei Wochen verwendet. Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Tracer erfolgte durch Präzipitation mit Trichloressigsäure. Sie lagen zwischen 100 bis $200\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

IV. Prüfung der Antikörpertiter und der Kreuzreaktionen

Nach MIDGLEY geben die Bindungsanalysen des Antikörpers mit radioaktivmarkierten Hormonen die besten Aussagen über die Eigenschaften eines Antiserums (51). Die Überlegenheit dieser Methodik zeigt sich durch die Möglichkeit, die Ergebnisse quantitativ bei hoher Sensitivität und Präzision und damit frei von subjektiver Bewertung auszudrücken.

Von den einzelnen Antiseren wurden mit 0.1% HSA 0.05 molarem Phosphatpuffer graduell unterschiedliche Verdünnungen hergestellt. 50 µl der jeweiligen Verdünnung des Antiserums, 50 µl 0.05 molarer Phosphatpuffer mit 0.1% HSA und 50 µl radioaktives Hormon, das mit Puffer auf eine Aktivität von etwa 10 000 cpm (Zählrate/Minute) eingestellt wurde, sowie 20 µl Pferdeserum wurden kurze Zeit in einem Reaktionsgefäß mit einem Vortexmischer gemischt. Die Reaktionsgefäße bedeckten wir mit Parafilm, um die Austrocknung des Reaktionsgemisches während der Inkubationszeit zu verhindern. Für sämtliche Vergleichsuntersuchungen wurden die entsprechenden Endverdünnungen und Inkubationszeiten eingehalten. Die Verdünnungen und die Inkubationszeiten werden jeweils in den Ergebnissen aufgeführt.

Nach der Methode von ROEMMLER und SAXENA wurde die Trennung des freien und des an den Antikörper gebundenen radioaktiven Hormones mit einer Aethanol-Ammoniumazetatlösung (1 ml Lösung

von 6.6% Ammoniumazetat und 66% Aethanol) vorgenommen (63). Nach 20 Minuten Zentrifugation mit 5000 Umdrehungen in einer gekühlten Zentrifuge wurden die Überstände abgesaugt. Der Niederschlag wurde in einem automatischen Gammacounter (Packard Instr., Downers Grove, Ill., U.S.A.) gemessen.

Die gleichen Versuchsbedingungen galten für ein negatives Kontrollserum, das aus dem Pool der Kaninchenseren vor der Immunisation stammte. Ebenso wurde in jedem Versuch und für jedes Hormon die Trennungsgüte des Alkohol-Ammoniumazetat-Gemisches durch Bestimmung des sogenannten Blanks geprüft (Reaktionsgemisch von 100 μ l Puffer, 20 μ l Pferdeserum und 50 μ l Tracer, zu dem 1 ml Trennungsmittel gegeben wurde). Durchschnittlich 3 bis 7 Prozent des freien radioaktiv-markierten Hormones wurden unspezifisch präzipitiert und dementsprechend bei den Berechnungen berücksichtigt.

Die Versuchsausführungen erfolgten stets in Duplikaten. Die Bindungsraten werden in Prozenten der vorgegebenen Totalaktivität unter Berücksichtigung der unspezifischen Fällung und der Leerimpulsrate des Gammacounters angegeben.

V. Durchführung der Immunoabsorptionen

Nach Feststellung der Bindungskapazitäten und der Kreuzreaktionen wurden die Antiseren in einer Versuchsserie

zunächst mit nativen Hormonen absorbiert. In einer weiteren Versuchsanordnung wurden zudem die Immunoabsorption mit Alpha-Untereinheiten von HCG und anschließend nativen Hormonen durchgeführt.

Die cruden Antiseren wurden in verschiedenen Konzentrationsgraden mit verschiedenen Mengen der Absorbenshormone versetzt. Hierauf folgte eine einstündige Inkubation bei 37° Celsius. Nach weiterer Inkubation von mindestens 24 Stunden bei minus 4° Celsius wurden die Reaktionsgemische 20 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute in einer gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden mit Pasteurpipetten abgesaugt. Das Präzipitat wurde verworfen. Die Überstände wurden entsprechend den Ausgangsanalysen verdünnt und erneut unter den gleichen Inkubationsbedingungen die Kreuzreaktivität bestimmt.

Die Absorptionen wurden in folgender Mengenbeziehung durchgeführt :

- a) 0.1 ml crudes Antiserum wurde 1 : 5 verdünnt
(Gesamtmenge 0.5 ml)
- b) 0.2 ml crudes Antiserum wurde 1 : 100 verdünnt
(Gesamtmenge 20 ml)

Die Mengenangaben für die verwendeten Absorbentien sind auf diese unter a) und b) angegebenen Mengen von Antiserum bezogen.

Die Absorbenskonzentrationen für LH und FSH werden in den Ergebnissen als Internationale Einheiten, bezogen auf den Referenzstandard des 2.IRP-HMG, angegeben. HCG wird bezogen auf das 2. IRP-HCG angegeben. HCG-Alpha, das nur eine sehr geringe biologische Aktivität hat, wird in direkten Mengen aufgeführt.

Von allen vier Hormonen wurden Stammlösungen hergestellt. 970 µg LH, 920 µg FSH und 420 µg HCG wurden in 1000 µl 0.05 molarem Phosphatpuffer gelöst. In 1 µl dieser ersten Stammlösung waren damit 5 IU der Hormone enthalten. Die zweite Stammlösung enthielt nach Verdünnung von 100 µl der ersten Lösung mit 900 µl Puffer 0.5 IU pro µl. Die dritte Stammlösung nach Verdünnung von 100 µl der zweiten Stammlösung 1 : 10 enthielt 0.05 IU pro µl. 1000 µg HCG-Alpha wurden in 1000 µl Puffer gelöst, absorbiert wurde mit 5 bis 100 µg HCG-Alpha.

VI. Prüfung der Sensitivität und Spezifität

Die für den Radioimmunoassay geeignete Antikörperkonzentration wurde durch Titrationskurven der Antiseren festgestellt. Die Sensitivität der Antiseren wurde durch Inhibitionskurven geprüft. Zu dem Reaktionsgemisch von Antikörper und Tracer wurden ansteigende Konzentrationen vom gleichen nativen Hormon hinzugegeben. Durch diese Versuchsanordnung wurde

der günstigste Arbeitsbereich des verwendeten Antiserums festgestellt. Durch die bereits beschriebenen Bindungsanalysen mit radioaktivmarkierten Hormonen wird die Spezifität eines Antiserums weitgehend bestimmt. Daneben hängt die Spezifität von der gewählten Antikörperkonzentration und der Höhe der zu erwartenden kreuzreagierenden Hormone in den zu untersuchenden Serumproben ab. Es wurden daher bei jedem verwendeten Antiserum gleichzeitig Inhibitionskurven mit den möglicherweise kreuzreagierenden Hormonen durchgeführt.

VII. Radioimmunoassays

Bei den Radioimmunoassays von FSH, LH und HCG gingen wir nach der von ROEMMLER und SAXENA angegebenen Methodik vor (63). 20 bis 50 μ l Serum, 50 μ l 0.05 molarer Phosphatpuffer (pH 7.5), der 0.1% HSA und 1 : 25 000 verdünntes Merthiolat enthielt, 50 μ l Antiserum in geeigneter Konzentration wurden in Plastikreaktionsgefäße pipettiert und kurz gemischt. Die Gefäße wurden mit Parafilm bedeckt und anschließend bei minus 4° Celsius inkubiert. Daran schloß sich die Zugabe von 50 μ l radioaktivmarkiertem Hormon an, gelöst in 0.05 molarem Phosphatpuffer (Hormonäquivalent 0.05 ng). Die durchschnittliche Totalaktivität betrug 10 000 cpm. Nach weiterer Inkubation von 48 Stunden bei minus 4° Celsius wurde 1 ml einer frisch hergestellten Alkohol-Ammoniumazetat-lösung mit einer Konzentration von 66% Alkohol und

6.6% Ammoniumazetat (bezogen auf das Endvolumen) hinzugegeben und gemischt. Anschließend wurde das Gemisch bei 5000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände, die das freie, nicht an den Antikörper gebundene radioaktiv-markierte Hormon enthielten, konnte die Radioaktivität der Präzipitate in einem automatischen Gammacounter gemessen werden. In jedem Assay wurden Referenzseren mitbestimmt. Außerdem wurde immer die unspezifische Fällung bestimmt.

Zur Auswertung der Standardkurven, der Standardparameter und der unbekannten Serumproben bedienten wir uns eines Computerprogrammes, das die Anwendung der von RODBARD angegebenen Logit-log Transformation zur Linearisierung der Standardkurve erlaubt (64).

II. Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Seren stammen von Patientinnen der Sprechstunde für kinderlose Ehepaare der Frauenklinik Charlottenburg der Freien Universität Berlin. Die Patientinnen sind während des Beobachtungszyklus schwanger geworden. Diese Seren eigneten sich dazu, die Spezifität der entwickelten Radioimmunoassays mit Beta-Untereinheiten zu prüfen.

Das Blut wurde sofort nach Entnahme bei 2000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und bis zur radioimmunologischen Untersuchung bei minus 20° Celsius gelagert.

C ERGEBNISSE

I. Antiserenmengen

In der 8. Woche nach Erstimmunisierung wurden folgende Antiserenmengen gewonnen:

<u>Art</u>	<u>Kaninchen</u>	<u>Menge ml</u>
HCG-Beta-Antiserum	R 1	7.5
"	R 2	9
"	R 3	10
"	R 4	7
LH-Beta-Antiserum	R 5	10
"	R 6	10
"	R 7	15
"	R 8	6
FSH-Beta-Antiserum	R 9	9
"	R 10	10
"	R 11	12
"	R 12	11
HCG-Alpha-Antiserum	R 13	7
"	R 14	10
"	R 15	11
"	R 16	12

Die HCG-Alpha-Antiseren wurden in dieser Studie nur zum Vergleich der Immunoreaktivität von alpha- und betaspezifischen Antiseren herangezogen. Für alle Antiseren wurde der gleiche Untersuchungsgang eingehalten:

1. Bestimmung des Antikörpertiters und damit Auswahl der geeigneten Antiseren,
2. Bestimmung der Spezifität und Auswahl zur Immunoabsorption,
3. Verwendbarkeit im Radioimmunoassay durch Inhibitionsstudien vor und nach Immunoabsorption.

II. HCG-Beta-Antiseren

1. Antikörpertiter

In der Abbildung 1 sind die nach fünftägiger Inkubation erzielten Bindungsraten in den Antikörperverdünnungen 1 : 1000 bis 1 : 160 000 (Endverdünnung $\times 3.4$) dargestellt. Die Antiseren R 1 und R 3 wiesen bereits in der ersten Verdünnungsstufe (1 : 1000) mit einer Bindungskapazität von 49.1% bzw. 38.2% eine zu geringe Antikörperkonzentration auf. Die Bindungskapazität fiel in den weiteren Titrationsstufen steil ab. In einer Verdünnung von 1 : 20 000 konnten diese beiden Antiseren den Tracer HCG-125 J nicht mehr binden.

Die Antiseren R 2 und R 4 hatten eine höhere Antikörperkonzentration bzw. eine höhere Affinität zum Tracer. Antiserum R 2 band in einer Verdünnung von 1 : 20 000 50% des Tracers, Antiserum R 4 in einer Verdünnung von 1 : 15 000 (Endverdünnung $\times 3.4$).

2. Spezifität

Die Antiseren wurden in einer Verdünnung von 1 : 10 000 (Endverdünnung 1 : 34 000) einen Tag mit radioaktiv-markiertem HCG ", LH " und FSH " (" = radioaktivmarkiertes Hormon) inkubiert und anschließend die Bindungsfähigkeit bestimmt.

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse der Bindungsanalysen der HCG-Beta-Antiseren dargestellt. Die vier Antiseren zeigten in jedem Falle die höchste Bindungskapazität mit HCG ". Die Bindungsraten waren bei eintägiger Inkubationsdauer bei R 1 11.9%, R 2 42.9%, R 3 9.09% und R 4 33.1%. Die Bindungsfähigkeit zu LH " (R 1 3.3%, R 2 24.5%, R 3 3.1%, R 4 1.5%) war stets größer als die zu FSH " (R 1 0.8%, R 2 18.1%, R 3 0.7%, R 4 0%).

Das Antiserum R 4 war nach dem Ergebnis der Bindungsanalysen annähernd monospezifisch.

a) Vergleich mit dem HCG-Beta-Antiserum (Cr 100 B)

Von Frau Dr. VAITUKAITIS wurde uns freundlicherweise ein HCG-Beta-Antiserum zur vergleichenden Untersuchung zur Verfügung gestellt. Unter unseren Versuchsbedingungen betrug die spezifische Bindungskapazität 13.2% der Totalaktivität, mit LH " war eine Bindungsfähigkeit von 3.9% vorhanden (Kreuzreaktivität 30.2%), während FSH " nicht mit diesem Antiserum binden konnte.

b) Vergleich mit den HCG-Alpha-Antiseren

Es besteht ein auffallender Unterschied zwischen dem Immunisierungsergebnis mit HCG-Beta und HCG-Alpha, der das immunologische Bindungsverhalten dieser beiden Antiserengruppen mit den intakten normalen HCG, LH und FSH charakterisiert (vergleiche Abbildung 2 mit Abbildung 9). Während bei den HCG-Beta-Antiseren die

Bindungsaffinität eindeutig auf das spezifische intakte Hormon gerichtet ist, ist bei den HCG-Alpha-Antiseren, abgesehen von der zweimal höheren Bindungsrate mit FSH", keine bevorzugte Bindungsfähigkeit für eines dieser Hormone feststellbar.

3. Inhibitionsstudien

Die Antiseren R 1 und R 3 wurden aufgrund der Ergebnisse der Titrationskurven (Abbildung 1) und der Bindungsanalysen (Abbildung 2) von den Inhibitionsstudien ausgeschlossen.

Zur Untersuchung der Sensitivität und Spezifität bei der für den Radioimmunoassay optimalen Antikörperkonzentration stellten wir für die Antiseren R 2 und R 4 Inhibitionskurven auf.

In Abbildung 3 ist die Inhibitionskurve des Antiserums R 2 dargestellt (Computerausdruck). Die Standardkurve war im Bereich von 0.02 ng bis 2.5 ng ausreichend sensitiv. Die Inhibitionskurven mit LH und FSH verliefen signifikant unterschiedlich zur HCG-Dosiskurve. Erst 20 ng LH bewirkten eine äquivalente 50%ige Verdrängung des Tracers wie 0.34 ng HCG. Die FSH-Dosiskurve hatte bis zur geprüften Menge von 100 ng FSH einen zur Standardkurve noch deutlich unterschiedlicheren Verlauf. Auch für das Antiserum R 4 konnte im Bereich von 0.02 ng bis 2.5 ng HCG eine Affinität und damit Sensitivität bei einer Antikörperverdünnung von 1 : 20 000 (Endverdünnung x 3.4) dargestellt werden (siehe Abbildung 4). Mengen bis

zu 100 ng LH bzw. FSH hatten keinen Einfluß auf die spezifische Bindungskapazität. Vergleichsweise sind dazu die Inhibitionskurven des HCG-Alpha-Antiserums R 16 in Abbildung 5 dargestellt. Alle drei Inhibitionskurven verliefen annähernd parallel, d.h. eine 50%ige Verdrängung des Tracers wurde durch äquivalente Mengen an HCG, FSH und LH hervorgerufen.

4. Immunoabsorptionen

a) mit nativen Hormonen

aa) Absorption mit LH : 0.1 ml Antiserum

Je 0.1 ml Antiserum (Verdünnung 1 : 5) wurden mit 2.5 IU, 5 IU und 10 IU LH versetzt und inkubiert.

Das Ergebnis der Bindungsanalysen nach dieser Absorption kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Absorbens LH IU	Bindungskapazität mit		
	HCG "	LH "	FSH "
0	42.9	24.4	18.1
2.5	24.4	4.2	3
5	22.0	2.9	2.8
10	19.7	2.4	1.5

Tabelle 1 : Bindungsanalysen des Antiserums R 2 (0.1 ml) nach Absorption mit LH.

Antikörperverdünnung 1 : 10 000.

Inkubation: 24 Stunden

Bereits in der ersten Absorptionsstufe mit 2.5 IU kam es zu einem 43.2%igen Rückgang der Bindungskapazität zu HCG ". Dieser Rückgang nahm mit Steigerung der Absorbenskonzentration zu (5 IU 48.7%, 10 IU 53.7%). Sowohl die Kreuzreaktivität mit LH " als auch die mit FSH " wurde bereits in der ersten Absorptionsstufe vermindert, betrug aber immerhin noch 17.2% für LH und 12.3% für FSH (bezogen auf die Bindungskapazität mit HCG). Durch die starke Verminderung der Bindungskapazität zu HCG bei nicht maximaler Reduktion der Kreuzreaktion war dieser Absorptionsmodus nicht geeignet, das Antiserum von kontaminierenden Antikörpern zu reinigen.

ab) Absorption mit LH und FSH : 0.2 ml Antiserum

Das Mengenverhältnis zwischen Antiserum und Absorbens wurde geändert. 0.2 ml Antiserum wurden im Verhältnis 1 : 100 verdünnt und je 20 ml dieser Verdünnung mit

- (1) LH 2.5 IU, 5 IU und 10 IU (Abb. 6 A) absorbiert.
- (2) Reabsorption mit 10 IU FSH von 1 (Abb. 6 B)
- (3) Absorption mit FSH 2.5 IU, 5 IU und 10 IU FSH (Abb. 6C)
- (4) (nach Kenntnis der Ergebnisse der Immunoabsorption von 3)

Absorption mit FSH 25 IU, 50 IU und 100 IU (Abb. 6D)

- ad (1) Ebenso wie in der Absorption mit 0.1 ml Antiserum (Tab. 1) trat ein - wenn auch geringerer - Rück-

gang der Bindungskapazität mit HCG " auf, der, von der Absorbenskonzentration abhängig, zwischen 11.7% und 48% betrug. Die Kreuzreaktivität zu LH " und FSH " wurde nur gering vermindert. Erst in der 3. Absorptionsstufe, die auch den höchsten Bindungsverlust des Antiserums zu HCG aufwies, wurde die Bindungsfähigkeit zu LH " auf 13% und zu FSH " auf 27.8% reduziert.

- ad (2) Durch die Reabsorption mit je 10 IU FSH in allen Absorptionsstufen der mit LH präabsorbierten Antiseren wurde die Bindungskapazität zu HCG " nicht weiter beeinflußt. Allerdings wurden die Kreuzreaktionen nicht entscheidend vermindert.
- ad (3) Die Absorption mit niedrigen Mengen an FSH hatte keine Auswirkungen auf die Bindungskapazität mit HCG ". Jedoch blieb die Bindungsfähigkeit mit FSH " mit 47%, 44% und 37% unverändert hoch. Zur maximalen Reduktion der Kreuzreaktion bei stabiler Bindungskapazität zu HCG erhöhten wir die FSH-Absorbensmengen.
- ad (4) Die Kreuzreaktion zu LH " ging auf 6.7%, 6.6% und 1.9% und die mit FSH " auf 7.6%, 5.4% und 1.75% zurück.

b) Absorption mit HCG-Alpha

In einer 2. Versuchsserie gingen wir von der Überlegung aus, daß durch Absorption mit Alpha-Untereinheiten Antikörper, die gegen die gemeinsamen antigenen Determinanten der Alpha-Untereinheiten gerichtet sind, eliminiert werden können. Dieser Versuch wurde mit dem Antiserum R 2 (0.2 ml Antiserum, Verdünnung 1 : 100) unternommen (Tab. 2).

Absorbens	Menge	Bindungskapazität mit		
		HCG "	LH "	FSH "
HCG-Alpha	0	45.9	21.4	17.2
	5 ug	43.8	17.2	10.2
	10 ug	42.8	15.3	7.2
	20 ug	44.1	7.5	3.2
	100 ug	45.2	6.2	3.4

Tabelle 2 : Bindungsanalysen des Antiserums R 2 (0.2 ml) nach Absorption mit HCG-Alpha.
Antikörperverdünnung 1 : 10 000.
Inkubation: 24 Stunden.

Die HCG-Alpha-Absorption führte zu keiner Beeinträchtigung der Bindungskapazität des Antiserums zu HCG ". Die Kreuzreaktivität sowohl zu FSH " als auch zu LH " wurde mittelgradig gesenkt. Die Steigerung von 20 ug HCG-Alpha auf 100 ug verursachte keine weitere Reduktion der Kreuzreaktivität.

Zur maximalen Reduktion der Kreuzreaktion wurde eine Reabsorption mit nativen Hormonen angeschlossen.

Das mit 100 ug HCG-alpha absorbierte Antiserum wurde mit 50 IU FSH absorbiert. Die Bindungskapazität mit HCG " betrug danach 41.8%. Das Bindungsvermögen für LH " lag bei 0.9%, das für FSH " bei 0.3%. Durch die beiden Absorptionen wurde ein annähernd vollständiges Diskriminationsvermögen dieses Antiserums erreicht. In Abbildung 7 ist als Beispiel die Standardkurve des mit 100 ug HCG-alpha und 50 IU FSH absorbierten Antiserums dargestellt. Die in Abbildung 2 ersichtliche Kreuzreaktivität mit LH und FSH war nahezu eliminiert.

III. FSH-Beta-Antiseren

1. Antikörpertiter

Die nach 8-wöchiger Immunisierungsdauer erzielten Antikörpertiter, bei denen 40% bis 50% des Tracers FSH gebunden wurden, lagen bei Kaninchen R 9 und R 12 bei 1 : 10000 (siehe Abb. 8). Eine ungenügende Antikörperproduktion wurde durch die Titrationskurven für das Antiserum R 11 ersichtlich. In einer Verdünnung von 1 : 1000 wurden nur 31% des Tracers gebunden. Das Antiserum R 10 nahm mit einer genügenden Bindungsfähigkeit bis zu einer Verdünnung von 1 : 5000 (Endverdünnung x 3.4) eine Mittelstellung ein.

2. Spezifität

Zur Kontrolle der Spezifität wurden die Antiseren in einer Konzentration von 1 : 10000 einen Tag mit FSH ", LH " und HCG " inkubiert.

Die mit FSH-beta erzeugten Antiseren zeigten mit einer Ausnahme (R II) ein relativ einheitliches Immunisationsergebnis (siehe Abb. 9). Läßt man das Antiserum R II unberücksichtigt, so erreichte die spezifische Bindungskapazität in dieser Versuchsordnung 26% (20.1% - 30.2%) und entsprach damit der mittleren Bindungskapazität der HCG-alpha-Antiseren.

Die Bindung zu LH " war mit 83% (70% - 98%) und zu HCG " mit 80% (66% - 98%) - bezogen auf die Bindungskapazität zu FSH " - gleichermaßen hoch. Im Vergleich mit den HCG-beta- und den LH-beta-Antiseren wies demnach keines dieser Antiseren ein ausreichendes Diskriminationsvermögen zwischen FSH und HCG sowie LH auf. Auffallend ist die Ähnlichkeit mit der im unteren Teil der Abbildung 9 dargestellten HCG-alpha-Immunisation.

3. Inhibitionsstudien

Das Antiserum R 11 wurde wegen seines geringen Antikörpertiters, das Antiserum R 10 wegen der hohen unspezifischen Bindungsmöglichkeiten für die weiteren Untersuchungen nicht verwendet. Die Antiseren der Kaninchen R 9 und R 12 poolten wir wegen ihrer ähnlichen Spezifität vor den Inhibitionsstudien.

Die Inhibitionskurve mit FSH als Standard erbrachte eine untere Nachweisgrenze von 0.03 ng per Reaktionsgefäß. Die gleichzeitig präparierten Inhibitionskurven mit LH und HCG bestätigten die erhebliche Kreuzaktivität dieses Antiserums (Abbildung 10).

4. Immunoabsorptionen

a) mit nativen Hormonen

aa) Absorption von 0.1 ml Antiserum

In einer ersten Versuchsanordnung wurden 0.1 ml des gepoolten Antiserums von R 9 und R 12 absorbiert mit

1. HCG 2.5 IU, 5 IU und 10 IU (Abb. 11 A)

2. LH 2.5 IU, 5 IU und 10 IU (Abb. 11 B).

Die Bindungsanalysen nach diesen Absorptionen können aus Abbildung 11 ersehen werden. Hierbei ist die Ausgangsbindungskapazität gleich 100 Prozent gesetzt. Die Abnahme der Kreuzreaktion ist auf die aktuelle Bindungskapazität mit FSH " bezogen. Sowohl die Absorption mit HCG (Abb. 11 A), als auch die mit LH führte ab 5 IU Absorbens zu einem erheblichen Verlust der Bindungskapazität zu FSH ". So lag der Rückgang bei Absorption mit 10 IU HCG bei 55% und bei 10 IU LH bei 63%. Die Kreuzreaktivität mit LH war nur durch die LH-Absorption ausreichend zu unterdrücken (Abb. 11 B).

Als Absorbens für dieses FSH-beta-Antiserum war nur LH geeignet. Wiederum wurde die Bindungskapazität stark durch die Absorbensmenge beeinflusst. Da in der ersten Absorptionsstufe mit 2.5 IU LH die Kreuzreaktion mit LH " bzw. HCG " 14 bzw. 15.1% betrug, führten wir eine weitere Absorptionsordnung mit anderen Konzentrationen durch.

ab) Absorption von 0.2 ml Antiserum

0.2 ml Antiserum (Verdünnung 1 : 100) wurden mit 2.5 IU, 5 IU und 10 IU LH absorbiert. Die Ergebnisse der Bindungsanalysen dieses Versuches sind in Tabelle 3 dargestellt.

Absorbensmenge LH IU	Bindungskapazität mit		
	FSH "	LH "	HCG "
0	30.3	24.5	23.4
2.5	30.1	3.31	2.8
5	26.5	1.17	1.2
10	24.5	0.03	0

Tabelle 3: Bindungsanalysen des Antiserums
R 9/12 (0.2 ml) nach Absorption mit LH.
Antikörperverdünnung 1 : 10 000.
Inkubation: 24 Stunden

Durch dieses Absorptionsverhältnis wurde die Bindungskapazität wesentlich geringer beeinflusst. Sie betrug bei Absorption mit 10 IU LH noch 24.5%, während die Kreuzreaktivität zu LH und HCG fast vollständig eliminiert wurde.

b) Absorption mit HCG-alpha

Die Absorption mit 100 µg HCG-alpha führte zu einer hochgradigen Reduktion der Bindungskapazität mit FSH ". Dieser Absorptionsmodus wurde nicht weiter verfolgt, da durch die LH-Absorption bereits ein annähernd spezifisches

Antiserum zur Verfügung stand.

Das Antiserum R 9/12 (absorbiert mit 10 IU LH) verwendeten wir für die radioimmunologischen Untersuchungen. In Abbildung 12 ist die Standardkurve dieses Antiserums dargestellt.

IV. LH-Beta-Antiseren

1. Antikörpertiter

Die immunogene Antwort aller 4 Kaninchen war im Gegensatz zu der HCG-beta- und FSH-beta-Immunisation gleichmäßig hoch (siehe Abbildung 13). Die Antiseren zeigten bis zu einer Verdünnung von 1 : 40 000 (Endverdünnung x 3.4) eine gute Affinität zum Tracer LH.

2. Spezifität

Die Ergebnisse der in einer Verdünnung von 1 : 10 000 mit eintägiger Inkubation durchgeführten Bindungsanalysen können der Abbildung 14 entnommen werden. Die Bindungskapazität unter diesen Versuchsbedingungen betrug 48.4% (37.5 bis 57.4%).

Ein Antiserum (R 5) hatte eine Antikörperpopulation, die eine komplette Kreuzreaktion mit HCG " aufwies. Die drei anderen Antiseren diskriminierten gut zu HCG ". Das Bindungsvermögen aller 4 Antiseren betrug im Mittel mit

HCG " 28.7% (Kreuzreaktion zu LH 59.7%) und ohne Berücksichtigung von R 5 17.2% (Kreuzreaktion 35.5%). Das Bindungsvermögen zu FSH " war mit 15.5% (Kreuzreaktion 32%) deutlich geringer.

Nach dem Ergebnis der Bindungsanalysen wurde das Antiserum R 5 für die weiteren Untersuchungen nicht verwendet. Die Antiseren R 6, R 7 und R 8 poolten wir wegen ihrer ähnlichen Bindungskapazitäten und der Spezifitäten.

3. Inhibitionsstudien

Die Inhibitionskurven dieses gepoolten Antiserums sind in der Abbildung 15 dargestellt. Um die äquivalente prozentuale Inhibition mit HCG zu erreichen, waren die 70-fachen Mengen erforderlich. Die FSH-Dosiskurve verlief signifikant unterschiedlich zur LH-Standardkurve.

Demnach war dieses LH-beta-Antiserum primär nicht geeignet, in Anwesenheit größerer Mengen an HCG im Radioimmunoassay eingesetzt zu werden.

4. Immunoabsorptionen

Ausgehend von den Erfahrungen mit der Absorption der HCG-beta-Antiseren wurde auf eine Absorption mit nativen Hormonen verzichtet und die primäre Absorption mit HCG-alpha durchgeführt.

Je 0.2 ml Antiserum inkubierten wir mit 5, 10, 20, 50 und 100 ug HCG-alpha. Die daran anschließenden Bindungsanalysen erbrachten das in Tabelle 4 dargestellte Ergebnis.

Absorbensmenge ug	Bindungskapazität mit		
	LH "	HCG "	FSH "
0	48.2	20.8	12.8
5	49.3	19.6	5.2
10	47.2	17.8	4.8
20	45.8	12.6	2.8
50	45.9	13.8	3.2
100	43.2	12.7	2.9

Tabelle 4: Bindungsanalysen des Antiserums R pool (0.2 ml)
nach Absorption mit HCG-alpha.
Antikörperversdünung 1 : 10 000.
Inkubation: 24 Stunden

Die Immunoabsorption mit HCG-alpha beeinflusste das spezifische Bindungsvermögen mit LH " kaum. Selbst bei 100 ug HCG-alpha als Absorbens blieb eine Bindungskapazität von 89.5% der Ausgangsbindung erhalten.

Sowohl in der Bindungsfähigkeit zu HCG " als auch FSH " trat ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Kreuzreaktion ein. Bis zu Absorbenskonzentrationen von 100 ug HCG-alpha verminderte sich die Bindungsfähigkeit zu HCG " um 39%, die zu FSH " um 78%. Allerdings betrug damit die Kreuzreaktion, bezogen auf die aktuelle Bindungskapazität, noch für HCG " 29% und für FSH " 6.7%.

Es wurde daher in dem mit 100 ug HCG-alpha absorbierten Antiserum eine weitere Absorption mit 50 IU HCG abgeschlossen. Nach dieser Absorption betrug die Bindungskapazität

40.5% mit LH ", die Bindungsfähigkeit mit HCG " 1.2% (Kreuzreaktion 2.9%), die mit FSH " 0.3% (Kreuzreaktion 0.7%).

Die Inhibitionskurve des so präparierten Antiserums ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Dosiskurven mit HCG und FSH verliefen nunmehr signifikant different zur LH-Kurve. Auch die Zugabe von 100 ng FSH bzw. HCG beeinflusste die Affinität des Tracers LH zum Antikörper nicht. Dieses Antiserum wurde für die klinischen Untersuchungen verwendet.

V. Anwendung der spezifischen Antiseren

Die durch die Immunoabsorption in ihrer Spezifität erhöhten Antiseren wurden für die radioimmunologische Bestimmung von LH, FSH sowie HCG im Serum verwendet.

Vor den Messungen der Serumkonzentrationen wurde für alle drei Radioimmunosysteme in Vorversuchen die Validität durch Serumverdünnungskurven und Wiederfindungsanalysen geprüft.

Folgende Antiseren wurden verwendet:

- 1) LH-beta-Antiserum R _{Poor}
(Immunoabsorption mit 100 ug HCG-alpha und 50 IU HCG)
- 2) FSH-beta-Antiserum R 9/12
(Immunoabsorption mit 10 IU LH)
- 3) HCG-beta-Antiserum R 4
(monospezifisch)
HCG-beta-Antiserum R 2
(Absorption mit 100 ug HCG-alpha und 50 IU FSH).

- ad 1) Insgesamt führten wir vier Assays mit diesem Antiserum durch. Die Standardkurve eines dieser Assays ist in Abb. 16 dargestellt. Sowohl die Verdünnungskurve eines Referenzserums, als auch die Wiederfindungskurve von LH, das zu einem Serum von einer hypophysektomierten Patientin hinzugefügt wurde, verlief parallel im gesamten Bereich der Standardkurve. Die Wiederfindung betrug $92\% \pm 7\%$ (± 2 SD). Der Koeffizient der Intra- und Interassayvariabilität von 3 Referenzseren mit bekanntem Hormongehalt, der in routinemäßig durchgeführten Radioimmunoassays für LH im Labor von Dr. SAXENA bestimmt worden war, betrug im mittleren Bereich der Standardkurve 9% bzw. 12%. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0.5 ng/ml.
- ad 2) Es wurden ebenfalls 4 Assays durchgeführt. Eine typische Standardkurve ist in Abbildung 12 dargestellt. Der Koeffizient der Intra- bzw. Interassayvariabilität war bei 24 Bestimmungen 9% bzw. 11%. Die Validität des Assaysystems war durch die Parallelität der Serienverdünnung eines Referenzserums zum FSH-Standard nachweisbar. Die untere Nachweisgrenze betrug bei Einsatz von 50 μ l Serum 0.6 ng/ml und war damit ausreichend für unseren Untersuchungszweck.
- ad 3) Zur Messung sehr niedriger HCG-Konzentrationen wurde das Antiserum R 4 verwendet, da die Standardkurve und die Auswertung der Standardparameter eine untere

Nachweisgrenze von 2 mIU/ml erbrachten. Mit dem absorbierten Antiserum R 2 lag die untere Nachweisgrenze bei 4.1 mIU/ml. Durchgeführt wurden fünf Assays. Der Koeffizient der Intra- und Interassayvariabilität war mit durchschnittlich 5% bzw. 8% für beide Antiseren ausreichend. Zwischen einem serienverdünnten HCG-enthaltenden Serum und der HCG-Standardkurve war für beide Antiseren Parallellität nachweisbar. Zur Eichung des Radioimmunoassaysystems wurde eine Standardkurve mit dem 2. IRP-HCG durchgeführt. Diese Dosiskurve verlief parallel zu der mit dem von Dr. BAHL zur Verfügung gestellten HCG, das als Routinestandard verwendet wurde. Dabei entsprach 1 ng HCG = 6.8 ± 1.2 mIU/2. IRP-HMG.

VI. Klinische Untersuchungen

1. LH- und FSH-Serumkonzentrationen

In Abbildung 17 sind die LH- und FSH- Serumkonzentrationen dreier Patientinnen vor und nach der Konzeption dargestellt. Der für die Ovulation typische LH-Peak lag bei Patientin BH. am 25. Tag, bei Patientin H.D. am 18. Tag und bei Patientin R.S. am 12. Tag nach Beginn der letzten Menstruationsblutung. Bei allen drei Patientinnen blieben die LH-serumkonzentrationen bis zum 50. Tag nach der letzten Menstruationsblutung nach dem Ovulationspeak im Bereich der präovulatorischen Werte und zeigten in den ersten Schwangerschaftswochen eine geringe Tendenz des Abfalls.

Die FSH-Spiegel zeigten den für den Menstruationszyklus typischen Verlauf. Ein FSH-Peak zur Zeit der Ovulation, der parallel zum LH-Peak verlief, konnte bei zwei Patientinnen festgestellt werden. Die FSH-Serumkonzentrationen blieben während der ersten Schwangerschaftswochen im Bereich der Basalsekretion, wiesen aber eine leichte Tendenz des Anstiegs auf.

2. HCG-Serumkonzentrationen

Es wurden die Seren von fünf Patientinnen untersucht. Wie aus der Abbildung 18 ersehen werden kann, wird die Spezifität des HCG-beta-Radioimmunoassays durch die Nullwerte an den Tagen vor der Ovulation und am Tage des LH-Peaks unterstrichen.

Eindeutig meßbare HCG-Serumkonzentrationen (die dreimal nachgemessen wurden) konnten bei einer Patientin H.D. am 7. Tag post conceptionem mit 2.4 mIU/ml erfaßt werden. Bei den anderen Patientinnen wurde HCG erstmals am 8. bis 11. Tag post conceptionem nachweisbar. An den folgenden Tagen stiegen die HCG-Serumkonzentrationen sehr rasch an und erreichten am 15. Tag post ovulationem Werte über 100 mIU/ml. Am 20. bis 22. Tag post ovulationem waren HCG-Serumspiegel von über 1000 mIU/ml nachweisbar.

D DISKUSSION

Antigene Ähnlichkeiten innerhalb der humanen Glykoproteohormone erschweren die Präparation von Antiseren, die zur selektiven radioimmunologischen Messung von LH, FSH und HCG geeignet sind (9, 14, 24, 47). Biologische und immunologische Studien haben gezeigt, daß in den Beta-Untereinheiten hormonspezifische antigene Determinanten lokalisiert sind (16, 24, 38, 65). Die Verwendung von Beta-Untereinheiten als Immunogene soll daher die Entwicklung spezifischer Antiseren erleichtern (66).

Bei der Immunisierung von LH, FSH und HCG mit Beta-Untereinheiten erhielten wir Antiseren, die sowohl in der Höhe der Antikörpertiter als auch in ihrer Spezifität innerhalb und zwischen den Immunisierungsgruppen unterschiedlich waren. Ausreichend hohe Antikörpertiter (1 : 10000 bis 1 : 40000 Initialverdünnung), die eine genügende Affinität und damit Sensitivität erwarten ließen, erhielten wir mit der von VAITUKAITIS et al (16) angegebenen Immunisierungstechnik bei 2 der 4 HCG-beta-Antiseren, bei allen 4 LH-beta-Antiseren und bei 2 der 4 FSH-beta-Antiseren (siehe Abbildungen 1, 8 und 13).

Unabhängig von der Höhe der Antikörpertiter traten in allen Immunisierungsgruppen in der Mehrzahl der Fälle die bekannten Kreuzreaktionen auf, wenn auch in gemäßigter Form als inkomplette Kreuzreaktionen mit unterschiedlicher Ausprägung (Abb. 2, 9, 14).

Eines unserer 12 Beta-Antiseren (HCG-beta-Antiserum R 4) entsprach der Forderung, die ODELL an ein primär spezifisches Antiserum stellt. Danach ist ein Antiserum vollkommen spezifisch, wenn zwischen anderen Hormonen und dem spezifischen Hormon (Antigen) keine kompetitive Hemmung an den Bindungsstellen des Antiserums entdeckt werden kann (19)(Abb. 4).

VAITUKAITIS et al erhielten ebenfalls bei der Immunisierung mit HCG-beta von 5 Tieren ein hochspezifisches Antiserum, mit dem sie einen spezifischen Radioimmunoassay für HCG bzw. HCG-beta entwickeln konnten (67). Unsere anderen Beta-Antiseren diskriminierten meist bis zu einem relativ hohen Grad in ihrem Bindungsverhalten zwischen dem homologen und den anderen Glykoproteohormonen (Abb. 2, 9, 14). Für die Entwicklung spezifischer Radioimmunoassays war die Mehrzahl der Antiseren nicht geeignet. Die Inhibitionskurven zeigten, daß z.B. während der Schwangerschaft im Serum auftretende HCG-Konzentrationen die Meßergebnisse von LH und FSH erheblich verfälschen würden (Abb. 10, 15). Ähnliche inkomplette Kreuzreaktionen traten nach VAITUKAITIS et al bei einigen ihrer HCG-beta-Antiseren und allen ihrer LH-beta-Antiseren auf (24, 68).

Nach den Dosiskurven waren aber in allen weiter untersuchten Beta-Antiseren spezifische Bindungsstellen vorhanden, da sie bei den kreuzreagierenden Hormonen nicht parallel zu den Kurven des homologen Hormons verliefen (Abb. 3, 10, 15). Dagegen konnte mit den HCG-alpha-Antiseren eine Parallelität der Dosiskurven

demonstriert werden, d.h. die Bindungsstellen des HCG-alpha-Antiserums banden in den Glykoproteohormonen gleichartige antigene Determinanten (Abb. 5).

Als Ursache für die unspezifischen Bindungsaffinitäten der Beta-Antiseren kommen in Betracht:

1. Kontaminationen des Immunogens mit der komplementären Alpha-Untereinheit bzw. dem entsprechenden nativen Hormon und
2. primär vorhandene strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den Beta-Untereinheiten (24, 66).

VAITUKAITIS et al berichten, daß eine von ihnen verwendete FSH-beta-Immunogenpräparation im HCG-alpha Radioimmunoassay-System eine parallele Dosiskurve zu HCG-alpha aufwies. Erst nach Affinitätschromatographie dieses Präparates führte dessen Verwendung als Immunogen zu einem nur noch gering kreuzreagierenden Antiserum (69).

Die Reinigungsprozeduren zur Darstellung gänzlich kontaminationsloser Untereinheiten sind schwierig (70). Biologische Studien mit Radioligandassays zeigen meist eine restliche biologische Aktivität der Beta-Untereinheiten (60, 71, 72). Diese biologische Aktivität kann mit Alpha-Antiseren neutralisiert werden, womit die Kontaminationen der zur Verfügung stehenden Beta-Immunogene nachgewiesen sind. Von dem ersten HCG-beta-Präparat (CR 100 beta) wird eine fast 20%ige Kontamination mit Alpha-Untereinheiten berichtet (24).

Die stärkere Kreuzreaktivität der HCG-beta-Antiseren mit LH bzw. der LH-beta-Antiseren mit HCG läßt ähnliche antigene Determinanten in den Beta-Untereinheiten dieser Hormone annehmen (Abb. 3, 15), Homologien in Strukturanteilen von LH-beta und HCG-beta sprechen für diese Annahme (44, 73).

Zur Eliminierung unspezifischer Antikörperpopulationen, ob sie durch Kontaminationen oder primär vorhandene Struktur-analogien auftraten, unterzogen wir unsere Antiseren der von vielen Autoren vorgeschlagenen Immunoabsorption mit nativen Hormonen (5, 6, 7, 19, 53, 54). Mit verschiedenen, in den Ergebnissen dargestellten Modifikationen, gelang meist die maximale Reduktion der Kreuzreaktionen. Allerdings war damit häufig ein Bindungs- und Sensitivitätsverlust verbunden (Abb. 6, 11 Tabelle 1, 3). Dagegen war der erstmals von uns beschrittene Weg der kombinierten Immunoabsorption mit HCG-alpha und nativem Hormon besser geeignet und zeigte einen Weg, mit inkompletten Kreuzreaktionen belastete Antiseren ohne Sensitivitätsverlust in ihrer Spezifität zu steigern (Tab. 2, 4). Die HCG-alpha-Absorption gab zudem Hinweise auf die Ähnlichkeiten der antigen-reaktiven Stellen der Beta-Untereinheiten. So konnte jeweils die Kreuzreaktivität der HCG-beta-Antiseren zu LH und die der LH-beta-Antiseren zu HCG im geringeren Maße als die zu FSH durch HCG-alpha-Absorption reduziert werden. Die Kreuzreaktivität mit FSH war also stärker durch Bindungsstellen bedingt, die gegen Alpha-Strukturen gerichtet waren. Erst durch weitere Absorptionen mit intakten Hormonen, die bekanntermaßen auch beta-spezifische

antigene Stellen aufweisen, gelang es, gleiche Antikörperpopulationen weitgehend zu eliminieren, die sowohl mit LH, HCG als auch FSH binden können.

Der Vorteil der Immunisierung mit Beta-Untereinheiten ist darin zu sehen, daß trotz der geringen Anzahl von 12 Immunisationstieren Antiseren entwickelt werden konnten, die meist nur inkomplette Kreuzreaktionen aufwiesen. Diese Kreuzreaktionen ließen sich durch kombinierte Immunoabsorption mit HCG-alpha und nativem Hormon weitgehend eliminieren, mit Ausnahme der Kreuzreaktionen der FSH-beta-Antiseren. Mit diesen so präparierten spezifischen Antiseren und der von RÖMMLER und SAXENA angegebenen radioimmunologischen Technik konnten wir spezifische Radioimmunoassays für LH, FSH und HCG durchführen (Abb. 3, 4, 12, 16, 63).

Die Spezifität der entwickelten Radioimmunoassays wird durch die Ergebnisse klinischer Untersuchungen bestätigt (Abb. 17, 18). So haben HCG-Konzentrationen während der ersten Schwangerschaftswochen keinen Einfluß auf die radioimmunologische Messung von LH und FSH. Umgekehrt wurden bei dem HCG-beta-Antiserum-HCG-125 J-Assay LH- und FSH-Serumkonzentrationen nicht erfaßt (Nullwerte zur Zeit der Ovulation).

Die von uns während des Menstruationszyklus gemessenen LH- und FSH-Serumspiegel stimmen mit denen anderer Autoren überein (5, 74, 75).

Über die FSH-Sekretion während der ersten Schwangerschaftswochen sind die Ansichten gegensätzlich. So berichten JAFFE et al und PARLOW et al von einem Abfall der FSH-Serumkonzentrationen mit dem Auftreten der HCG-Produktion (76, 77). Auch CZYGAN et al sahen bei durch HMG induzierten Schwangerschaften diesen Abfall (79). Unsere FSH-Serumkonzentrationen entsprachen dagegen in den ersten Schwangerschaftswochen denen der postovulatorischen Zyklusphase und zeigten bei zwei Patientinnen einen leichten Anstieg. FAIMAN et al sowie MISHELL et al berichten ebenfalls über eine unveränderte bzw. leicht erhöhte FSH-Aktivität während der Schwangerschaft (79, 80). Der Frage, ob trotz erhöhter Steroidproduktion FSH unverändert produziert wird, sollte mit dem spezifischen FSH-beta-Radioimmunoassay in einer größeren Anzahl von Schwangerschaften nachgegangen werden.

Der spezifische HCG-beta-Antiserum-HCG-125 J-Radioimmunoassay kann zur frühen Schwangerschaftsdiagnose eingesetzt werden. Wir konnten wie KOSASA et al am 7. bis 11 Tag post conceptionem HCG im Serum nachweisen (Abb. 18) (81, 82). Diese Befunde stimmen gut mit den histologischen Studien von HERTIG überein (83). Er konnte in corpora lutea und im Endometrium am 7. bis 8. Tag nach der Ovulation - demnach 2 bis 3 Tage nach der Implantation - morphologisch Anzeichen einer HCG-Aktivität nachweisen. WIDE fand im Urin schwangerer Frauen am 8. Tag post ovulationem HCG (84).

Klinisch bedeutsam können spezifische HCG-beta-Radioimmunoassays in der Tumordiagnostik werden. BRAUNSTEIN et al konnten bei mehreren Karzinomarten eine ektope HCG-Produktion nachweisen, wobei die HCG-Serumkonzentration im Bereich physiologischer FSH- und LH-Serumspiegel lag (85).

ZUSAMMENFASSUNG

Je vier Kaninchen wurden mit Beta-Untereinheiten der Glykoproteohormone HCG, LH und FSH sowie mit Alpha-Untereinheiten von HCG immunisiert. Die durch eine multiple intradermale Immunisationstechnik erzielten Antiseren wiesen in der Mehrzahl ausreichende Antikörpertiter auf. Die Spezifität der Antiseren wurde durch Bindungsanalysen geprüft.

Ein HCG-beta-Antiserum war primär annähernd monospezifisch. Die übrigen Beta-Antiseren zeigten meist inkomplette Kreuzreaktionen unterschiedlichen Grades mit den anderen Glykoproteohormonen. Die HCG-alpha-Antiseren diskriminierten in ihrem Bindungsverhalten nicht zwischen HCG, LH und FSH.

Die Spezifität der Beta-Antiseren mit geringer Kreuzreaktivität und hohem Antikörpertiter konnte durch kombinierte Immunoabsorptionen mit HCG-alpha und nativen Hormonen erhöht werden. Sowohl das primär spezifische HCG-beta-Antiserum als auch ein durch Immunoabsorption von Kreuzreaktivitäten befreites HCG-beta-,

LH-beta- und FSH-beta-Antisérum konnte zur Entwicklung spezifischer Radioimmunoassays dieser Glykoproteohormone verwendet werden. Der HCG-beta-Radioimmunoassay ermöglichte im Serum die Messung von HCG-Konzentrationen, die im Bereich physiologischer LH- und FSH-Spiegel liegen. FSH und LH konnte in Anwesenheit hoher HCG-Serumkonzentrationen selektiv gemessen werden.

HCG wurde am 7. bis 11. Tag post conceptionem nachgewiesen. Die LH- und FSH-Sekretion der ersten Schwangerschaftswochen blieb im Bereich der Basalsekretion des Menstrualzyklus.

F LITERATURVERZEICHNIS

1. Berson, S.A. and R.S. Yalow
Quantitative aspects of reaction between insulin and
insulin-binding antibodies,
L.Clin.Invest. 38: 1996 (1959)
2. Berson, S.A. and R.S. Yalow
Immunoassay of protein hormones
in: Pincus, G., K.V. Thimann and E.B. Astwood (eds.),
The Hormones 4: 557, Academic Pres, New York (1964)
3. Odell, W., G. Ross and P. Rayford
Radioimmunoassay for HLH
Metabolism, 15: 287 (1966)
4. Faiman, C. and R. Ryan
Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone
J.Clin.Endocrinol.Metab. 27: 444 (1967)
5. Saxena, B.B., H. Demura, H.M. Gandy and R.E. Peterson
Radioimmunoassay of human follicle stimulating and
luteinizing hormones in plasma
J.Clin.Endocrinol.Metab. 28: 319 (1968)
6. Midgley, A.R., jr.
Radioimmunoassay for human chorionic gonadotrophin and
luteinizing hormone
Fed.Proc. 24: 162 (1965)
7. Midgley, A.R., jr.
Radioimmunoassay for human follicle stimulating hormone
J.Clin.Endocrinol.Metab. 27: 295 (1967)
8. Borth, R.
in: Wolstenholme, G.E.W. and M.P. Cameron (eds.),
Colloquia on Endocrinology 2: 45, Churchill, London (1952)

9. Franchimont, P.
Immunological behaviour of FSH, LH, HCG and TSH
in: Diczfalussy, E. (ed.), Immunoassay of Gonadotrophins,
1st Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive
Endocrinology, Karolinska sjukhuset, Stockholm, 70 (1969)
10. Franchimont, P.
A study of the cross-reaction between human chorionic and
pituitary luteinizing hormones (HCG and LH)
Europ.J.Clin.Invest. 1: 65 (1970)
11. Vaitukaitis, J.L., G.T. Ross and L.E. Reichert, Jr.
Assay of protein hormones related to human reproduction:
Problems of specificity of assay methods and reference
standards
Acta Endocrinol. (Kbh) 71: 625 (1972)
12. Midgley, A.R., jr., and L.E. Reichert, jr.
Specificity studies on a radioimmunoassay for human
follicle stimulating hormone
in: Margoulies, M. (ed.), Protein and Polypeptide Hormones
p. 117, ICS 161, Excerpta Medica, Amsterdam (1968)
13. Odell, W.D. and L.E. Reichert, jr.
Pitfalls in the radioimmunoassay of carbohydrate-
containing polypeptide hormones
in: Margoulies, M. (ed.), Protein and Polypeptide Hormones
p. 124, ICS 161, Excerpta Medica, Amsterdam (1968)
14. Schlaaff, S., S.W. Rosen and J. Roth
Antibodies to human follicle stimulating hormone:
complete cross-reactivity with three other hormones
J.Clin.Invest. 47: 1722 (1968)
15. Rabson, A.S., S.W. Rosen, A.H. Tashjian and B.D. Weintraub
Production of human chorionic gonadotropin in vitro
by a cell line derived from a carcinoma of the lung
J.nat.Cancer Inst. 50: 669 (1973)
16. Vaitukaitis, J.L., J. Robbins, E. Nieschlag and G.T. Ross
A method for producing specific antisera with small
doses of immunogen
J.Clin.Endocrinol.Metab. 33: 988 (1971)

17. Lehmann, F. and B.B. Saxena
Reinigung kreuzreagierender Antiseren gegen FSH und LH
38. Kongreß der Gesellschaft für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe, Hamburg, 1970, Abstract 351
18. Sato, N. and C.M. Cargille
Separation of specific from nonspecific anti-FSH
antibody by affinity chromatography on Sepharose-HCG
Endocrinology 90: 302 (1972)
19. Odell, W.D., G. Abraham, H.R. Raud, R.S. Swerdloff
and A. Fischer
Influence of Immunization Procedures on the Titer,
Affinity and Specificity of Antisera to Glycopolypeptides
in: Diczfalussy, E. (ed.), Immunoassay of Gonadotrophins,
1st Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive
Endocrinology, Karolinska sjukhuset, Stockholm, p.69 (1969)
20. Faiman, C. and R.J. Ryan
Mechanism of specificity in radioimmunoassay for human
FSH after HCG-adsorption of antisera
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 132: 691 (1969)
21. Rathnam, P. and B.B. Saxena
Subunits of FSH from Human Pituitary Glands
in: Saxena, B.B., C.G. Beling and H.M. Gandy (eds.),
Gonadotrophins, p. 120, Wiley-Interscience, New York (1972)
22. Swaminatham, N. and O.P. Bahl
Dissoziation and recombination of the subunits of
human chorionic gonadotropin
Biochem.Biophys.Res.Comm. 40: 422 (1970)
23. Morgan, F.J. and R.E. Canfield
Nature of the subunits of human chorionic gonadotropins
Endocrinology 88: 1045 (1971)
24. Vaitukaitis, J.L. and G.T. Ross
Antigenic similarities among the human glycoprotein
hormones and their subunits
in: Saxena, B.B., C.C. Beling and H.M. Gandy (eds.),
Gonadotrophins, p. 435, Wiley-Interscience, New York (1972)

25. Nureddin, A., K. Murakami, T. Inagami, P. Johnson and A.S. Hartree
Biochemical studies of human LH and its subunits
in: Margoulies, M. and F.C. Greenwood (eds.),
Structure-Activity Relationships of Protein and
Polypeptide Hormones,
p. 316, Excerpta Medica, Amsterdam (1971)
26. Shome, B. and A.F. Parlow
Human Follicle Stimulating Hormone (HFSH)
First proposal for the amino acid sequence
of the hormone specific β -subunit
J.Clin.Endocrinol.Metab. 39: 187 (1974)
27. Reichert, L.E. and A.F. Parlow
Further studies on the purification of human
pituitary luteinizing hormone
Endocrinology 75: 815 (1964)
28. Rathnam, P. and B.B. Saxena
Isolation and physicochemical characterization of
luteinizing hormone from human pituitary glands
J.Biol.Chem. 246: 7087 (1971)
29. Hartree, A.S.
Separation and partial purification of human LH
from pituitary glands
Biochem.J. 100: 754 (1966)
30. Saxena, B.B. and P. Rathnam
Purification of follicle-stimulating hormone
from pituitary glands
J. Biol.Chem. 242: 3769 (1967)
31. Peckham, W.D. and A.F. Parlow
On the isolation of human pituitary follicle-stimulating
hormone
Endocrinology 84: 953 (1969)

32. Roos, P.
Human Follicle Stimulating Hormone
Almqvist and Wiksells AB, Uppsala (1967)
33. Schuurs, A.H.W.M., E. de Jager and J.D. Homan
Studies on human chorionic gonadotropin,
III. Immunochemical characterization
Acta Endocrinol.(Kbh), 59: 120 (1968)
34. Bahl, O.P.
Human chorionic gonadotropin
I. Purification and physicochemical properties
J.Biol.Chem. 244: 567 (1967)
35. Canfield, R.E. F.J. Morgan, S. Kammerman, J.J. Bell
and G.M. Agosto
Studies of human chorionic gonadotropin
Rec.Progr.Horm.Res. 27: 121 (1971)
36. Bahl, O.P.
Studies on the primary structure of HCG and its
relationship to other glycoprotein hormones
in: B.B. Saxena, C.G. Beling and H.M. Gandy (eds.),
Gonadotropins, p. 200, Wiley-Interscience, New York (1972)
37. Ryan, R.J.N.S. Jrang and S. Haulon
Some physical and hydrodynamic properties of human FSH and LH
Rec.Progr.Horm.Res. 26: 105 (1970)
38. Saxena, B.B.
Introductory remarks on the status of FSH structure
and additional data on the subunits of FSH and LH,
in: Margoulies, M. and F.C. Greenwood (eds.)
Protein and Polypeptide Hormones, 11, 317, Excerpta
Medica, Amsterdam (1971)
39. Shome, B. and A.F. Parlow
The primary structure of the hormone specific
B-subunit of h-LH
J.Clin.Endocrinol.Metab. 36: 618 (1973)

40. Bishop, W.H. and R.J. Ryan
Human luteinizing hormone and its subunits:
Physical and chemical considerations
Biochem. 16: 3076 (1973)
41. Pierce, J.G., T.H. Liao, S.M. Howard and B. Shome
Studies on the structure of thyreotropin:
Its relationship to luteinizing hormone
Rec.Progr.Horm.Res. 27: 165 (1971)
42. Shome, B. and A.F. Parlow
Human Follicle Stimulating Hormone (hFSH):
First Proposal for the amino acid sequence of the
 α -subunit of human follicle stimulating hormone
J.Clin.Endocrinol.Metab. 39: 191 (1974)
43. Be-ilisario, R., R.B. Carlson and O.P. Bahl
Human Chorionic Gonadotropin: Linear amino acid
sequence of the α -subunit
J.Biol.Chem. 248: 6796 (1973)
44. Morgan, F.J., S. Birken and R.E. Canfield
Comparison of the chorionic gonadotropin and
luteinizing hormone
FEBS Letters 31: 4 (1973)
45. Reichert, L.E., G.M. Lawson jr., F.L. Leidenberger
and C.G. Trowbridge
Influence of α - and β -subunits on the Kinetics of
formation and activity of native and hybrid molecules
of LH and human chorionic gonadotropin
Endocrinology 93: 938 (1973)
46. Canfield, R.E., F.J. Morgan, S. Kammerman and G.T. Ross
Studies of the structure and recombination of the subunits
of the human chorionic gonadotropin,
in: Margoulies, M. and F.C. Greenwood (eds.), Structure-
Activity Relationships of Protein and Polypeptide Hormones
II, 341, Excerpta Medica, Amsterdam (1971)

47. Reichert, L.E., jr.

Preparation of human protein hormones for use in radioligand assays: Structure, function considerations, in: Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures in Clinical Medicine and Research, p. 16, IAEA, Wien (1974)

48. Odell, W.D. and M.A. Hescocx

Large scale production of specific antisera for radioimmunoassay of human follicle stimulating hormone, in: Margoulies, M. and F.C. Greenwood (eds.), Structure-Activity Relationship of Protein and Polypeptide Hormones, p. 139, Excerpta Medica, Amsterdam (1971)

49. Catt, K.J., H.D. Niall, G.W. Tregear and H.G. Burger

Disc-Solid Phase Radioimmunoassay of Human Luteinizing Hormone
J.Clin.Endocrinol.Metab. 28: 121 (1968)

50. Odell, W.D., G.T. Ross and D. Rayford

Radioimmunoassay for luteinizing hormone in human plasma or serum
J.Clin.Invest. 46: 248 (1967)

51. Midgley, A.R., jr., G.D. Niswender, V.L. Gay and L.E. Reichert, jr.

Use of antibodies for characterization of gonadotropins and steroids
Rec.Progr.Horm.Res. 27: 235 (1971)

52. Boorman, G.A., G.D. Niswender, V.L. Gay, L.E. Reichert, jr., and A.R. Midgley, jr.

Radioimmunoassay for follicle stimulating hormone in the rhesus monkey using anti-FSH serum and rat 131-I-FSH
Endocrinology 92: 618 (1973)

53. Odell, W.D., G.A. Abraham, W.R. Skowsky, M.A. Hescocx and D.A. Fischer

Production of antisera for radioimmunoassays, in: Odell, W.D. and W.H. Daughaday (eds.), Principles of Competitive Protein-Binding-Assays, p. 57, J.B. Lippincott Company, Philadelphia and Toronto (1971)

54. Dolais, J., P. Freychet and G. Rosselin
Immunological specificity and cross-reactions of human
pituitary glycoprotein hormones
Compt.Rend.Acad.Sci.(Paris), 267: 1105 (1968)
55. Franchimont, P.
Dosage radio-immunologique des gonadotrophines follicle-
stimulante et lutéinisante
J.Labelled. Compds. 2: 303 (1966)
56. Franchimont, P., J.C. Hendrick, A. Reuter and H.G. Burger
Radioimmunoassay of Glycoprotein Hormones,
in: Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures
in Clinical Medicine and Research, JAEA, Wien, p.195 (1973)
57. Odell, W.D., J.F. Wilber and W.E. Paul
Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum
J.Clin.Endocrinol.Metab. 25: 1179 (1965)
58. Hurn, B.A.L. and J. Landon
Antisera for radioimmunoassay
in: Kirkham, K.E. and W.M. Hunter (eds.), Radioimmunoassay
Methods, p. 121, Churchill Livingstone (1973)
59. Butt, W.R.
Chemistry of gonadotrophins in relation to their
antigenic properties
Acta Endocrinol. (bh), Suppl. 142: 13 (1969)
60. Catt, K.J., M.L. Dufau and T. Tsuruhara
Absence of intrinsic biological activity in LH and HCG subunit
J.Clin.Endocrinol.Metab. 36: 73 (1973)
61. Greenwood, F.C., W.M.Hunter and J.S. Glover
The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone
of high specific radioactivity
Biochem.J. 89: 114 (1963)

62. Leyendecker, G., D.M. Saunders and B.B. Saxena
Further improvements in the radioimmunoassay of human
pituitary follicle-stimulating-hormone (FSH)
Klin.Wschr. 148: 658 (1971)
63. Römmler, A. and B.B. Saxena
Separation of antibody-bound and free human follicle
stimulating and luteinizing hormones by ethanol-ammonium-
acetate
Acta Endocrinol. (Kbh), 72: 643 (1973)
64. Rodbard, D., P.L. Rayford, J.A. Cooper and G.T. Ross
Statistical quality control of radioimmunoassays
J.Clin.Endocrinol.Metab. 28: 1412 (1968)
65. Saxena, B.B., R. Malva, G. Leyendecker and H.M. Gandy
Further characterization of the radioimmunoassay of
human pituitary FSH,
in: Saxena, BB., C.G. Beling, H.M. Gandy (eds.),
Gonadotrophins, p. 399, Wiley-Interscience, New York (1972)
66. Ross, G.T., J.L. Vaitukaitis and J.B. Robbins
Preparation and properties of antisera made to alpha-
and beta-subunits of human chorionic gonadotropin,
in: Margoulies, M. and F.C. Greenwood (eds.),
Structure-Activity-Relationships of Protein and Polypeptide
Hormones, p. 153, Excerpta Medica, Amsterdam (1971)
67. Vaitukaitis, J.L., G. T. Braunstein and G.T. Ross
A radioimmunoassay which specifically measures human
chorionic gonadotropin in the presence of human
luteinizing hormone
A.J.Obstet.Gynec. : 751 (1972)
68. Vaitukaitis, J.L., G.T. Ross, L.E. Reichert jr. and D.N. Ward
Immunological basis for within and between species
cross-reactivity of luteinizing hormone
Endocrinology 91: 1337 (1972)

69. Vaitukaitis, J.L., G.T. Ross, J.G. Pierce, J.S. Cornell and L.E. Reichert jr.
Generation of specific antisera with the hormone specific β -subunits of hTSH or hFSH
J.Clin.Endocrinol.Metab. 37: 653 (1973)
70. Saxena, B.B.
Persönliche Mitteilung
71. Rayford, P.L., J.L. Vaitukaitis, G.T. Ross, F.J. Morgan and R.E. Canfield
Use of specific antisera to characterise biologic activity of HCG- β -subunit preparations
Endocrinology 91: 144 (1972)
72. Mogden, G.D., W.E. Nixon, J.L. Vaitukaitis, W.W. Tullner and G.T. Ross.
Neutralisation of primate chorionic gonadotropin activities by antisera against the subunit of human chorionic gonadotropin in radioimmunoassay and bioassay
Endocrinology 92: 705 (1973)
73. Rathnam, P. and B.B. Saxena
Amin acid sequence of human alpha- and beta subunits
Proc. of intern.Symposium on the Chemistry, Biology and Immunology of Gonadotropins, Bangalore, India (1973)
74. Faiman, C. and R.J. Ryan
Serum follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone concentration during the menstrual cycle as determined by radioimmunoassays
J.Clin.Endocrinol.Metab. 27: 1171 (1967)
75. Midgley, A.R. jr. and R.B. Jaffe
Regulation of human gonadotropins: IV. Correlation of serum concentration of follicle stimulating and luteinizing hormones during menstrual cycle
J.Clin.Endocrinol.Metab. 28: 1199 (1968)

76. Jaffe, R.B., P.A. Lee and A.R. Midgley jr.
Serum gonadotropin before, at the inception and following human pregnancy
J.Clin.Endocrinol.Metab. 29: 1281 (1969)
77. Parlow, A.F., T.A. Daane and W.F. Dignam
On the concentration of radioimmunoassayable FSH circulating in blood throughout human pregnancy
J.Clin.Endocrinol.Metab. 31: 213 (1970)
78. Czygan, P., J.F. Lehmann, M. Breckwoldt and G. Bettendorf
Continuous monitoring of plasma FSH, LH, HCG and placenta lactogen during HMG-induced ovulatory cycles and subsequent pregnancies
Acta Endocrinol. 70: 417 (1972)
79. Faiman, C., R.J. Ryan, S.J. Zwirek and M.E. Rubin
Serum FSH and HCG during human pregnancy and puerperium
J.Clin.Endocrinol.Metab. 28: 1323 (1968)
80. Mishell, D.R., J.H. Thorneycroft, Y.Nagata, T. Murata and R.M. Nakamura
Serum gonadotropin and steroid pattern in early human gestation
Am.J.Obstet.Gynec. 117: 631 (1973)
81. Kosasa, T.S., L.A. Levesque, D.P. Goldstein and M.L. Taymor
Clinical use of a solid-phase radioimmunoassay specific for human chorionic gonadotropin
Am.J.Obstet.Gynec. 119: 784 (1974)
82. Kosasa, T., L.Levesque, D.P. Goldstein and M.L. Taymor
Early detection of implantation using a radioimmunoassay specific for human chorionic gonadotropin
J.Clin.Endocrinol.Metab. 36: 622 (1973)
83. Hertig, A.T.
Gestational hyperplasia of endometrium
A morphologic correlation of ovar, endometrium and corpora lutea during early pregnancy
Lab.Invest. 13: 1153 (1964)

84. Wide, L.

Early diagnosis of pregnancy

Lancet 2: 863 (1969)

85. Braunstein, G.D., J.L. Vaitukaitis, P.P. Carbone
and G.T. Ross

Ectopic production of human chorionic gonadotropin

Ann.Intern.Med. 78: 39 (1973)

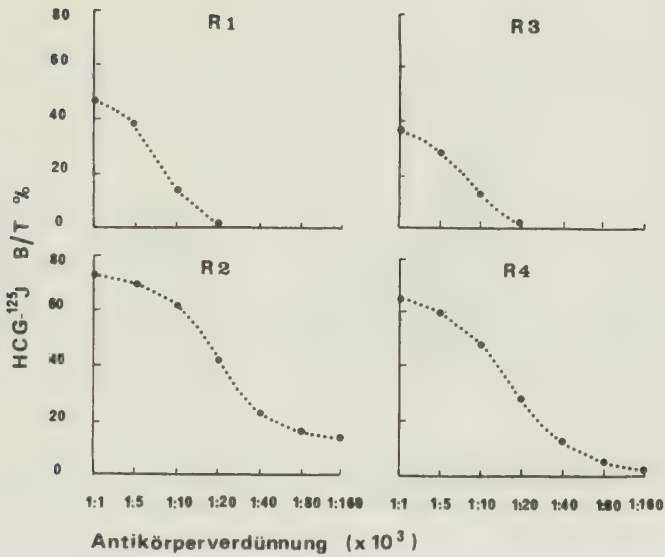


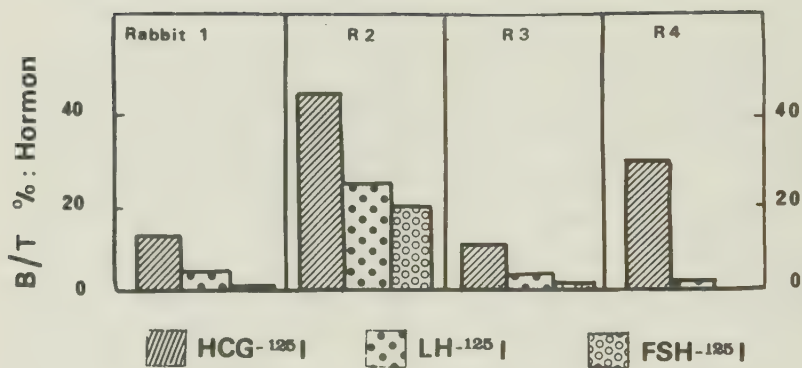
Abbildung 1

Titrationen der HCG- β -Antiseren

(Endverdünnung x 3.4). B/T % = antikörpergebundener Anteil des Tracers HCG-¹²⁵J abzüglich der unspezifischen Fällung und der Leerimpulsrate des Gammazählers.

Totalaktivität des Tracers 10 000 cpm.

Inkubation 5 Tage.



BINDUNGSKAPAZITÄTEN der HCG-beta-ANTISEREN

Abbildung 2

Bindungsanalysen der HCG- β -Antiseren.

Antikörperversdünnung 1 : 10 000 (Endverdünnung $\times 3.4$).

B/T % = antikörpergebundener Anteil der Tracer abzüglich der unspezifischen Fällung und der Leerimpulsrate.

Totalaktivitäten der Tracer 10 000 cpm.

Inkubation 24 Stunden.

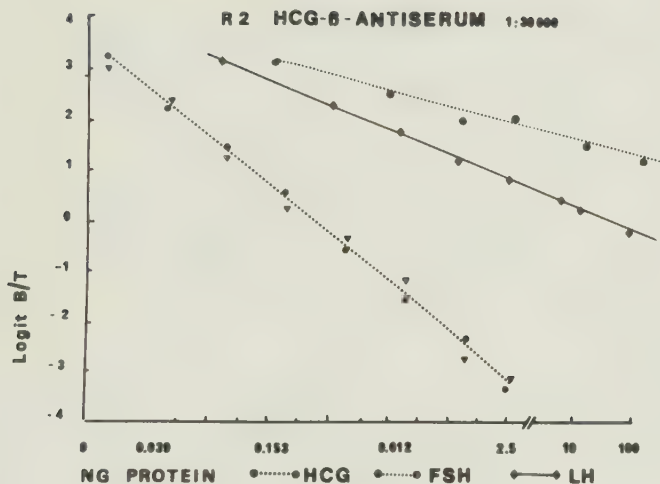


Abbildung 3

Inhibitionskurven von HCG, LH und FSH im
 Radioimmunoassaysystem: HCG-β-Antiserum (R 2)
 - HCG-¹²⁵J. (vor Immunoabsorption). Computerausdruck
 der Logit-Log-Transformationen der Inhibitionskurven :
 Standardparameter der HCG-Dosiskurve : Totalaktivität:
 8615 cpm, Unspezifische Fällung: 530 cpm,
 Leerimpulsrate: 165 cpm, (B/T) - 0: 0.361,
 Slope: - 0.953.

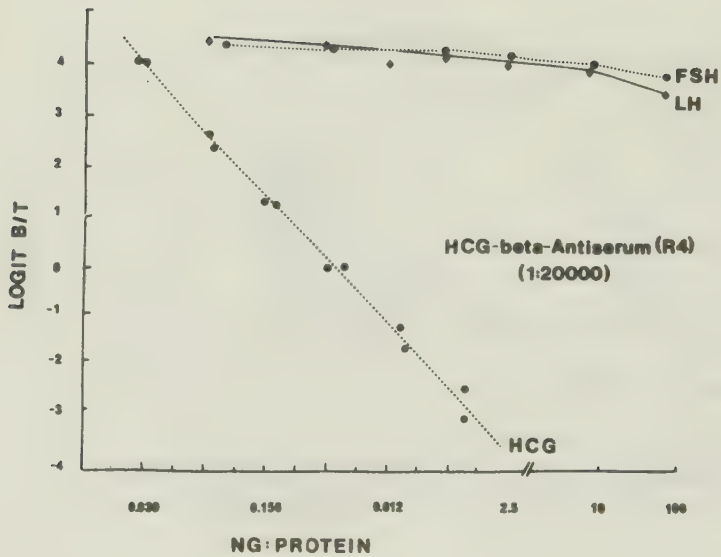


Abbildung 4

Inhibitionskurven von HCG, LH, FSH im
Radioimmunoassaysystem: HCG- β -Antiserum (R 4)
- HCG- ^{125}J . Computerausdruck der Logit-log-Transformationen
der Inhibitionskurven. Standardparameter der HCG-Dosiskurve:
Totalaktivität: 9420 cpm, unspezifische Fällung: 537 cpm,
Leerimpulsrate: 180 cpm, (B/T) -0 : 0.412, Slope: - 0.912.

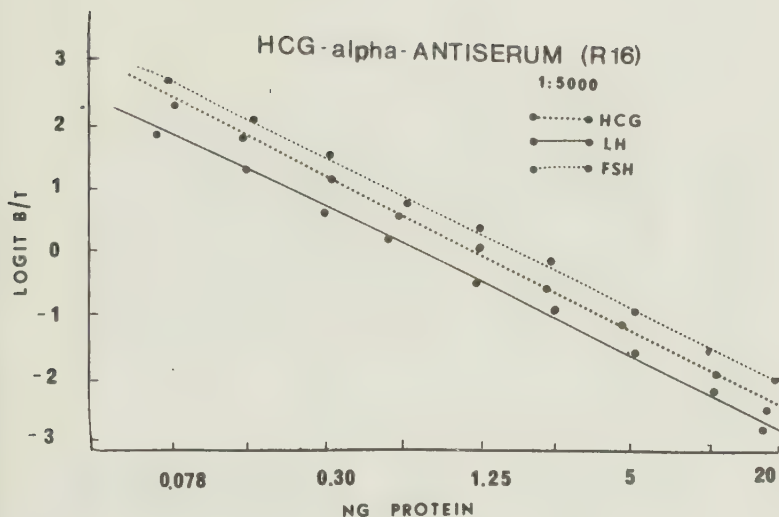


Abbildung 5

Inhibitionskurven von HCG, LH und FSH im Radioimmunoassay-system : HCG- α -Antiserum (R 16) - HCG-¹²⁵J.

Computerausdruck der Logit-Log-Transformation der Inhibitions-kurven. Standardparameter: Totalaktivität: 9632 cpm, unspezifische Fällung: 655 cpm, Leerimpulsrate 220 cpm, (B/T) -O : 0.12, Slope: - 0.572.

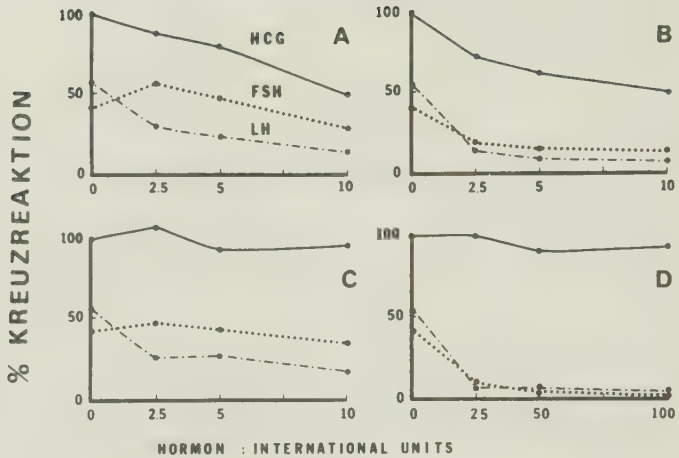


Abbildung 6

Bindungsraten des HCG- β -Antiserum (R 2) mit
HCG- ^{125}J , LH- ^{125}J und FSH- ^{125}J im Verhältnis zu den
Absorbenskonzentrationen von

- A. 2.5, 5, 10 IU LH
- B. 2.5, 5, 10 IU LH und anschließend 10 IU FSH
- C. 2.5, 5, 10 IU FSH
- D. 25, 50, 100 IU FSH

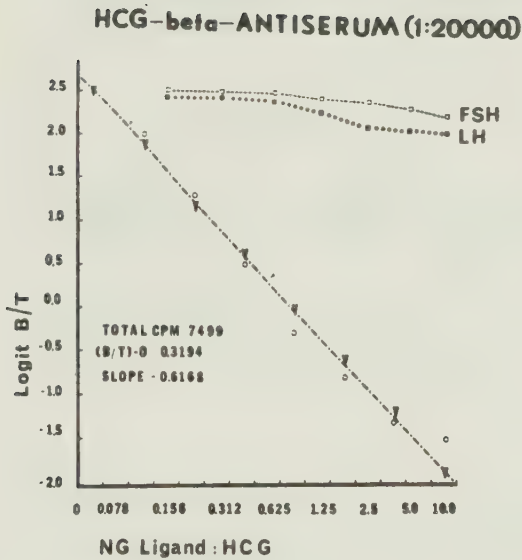


Abbildung 7

Inhibitionskurven von HCG, LH und FSH
im Radioimmunoassaysystem:

HCG-B-Antiserum (R 2) - HCG-¹²⁵J

nach Immunoabsorption des Antiserums mit
100 µgHCG-α und 50 IU FSH.

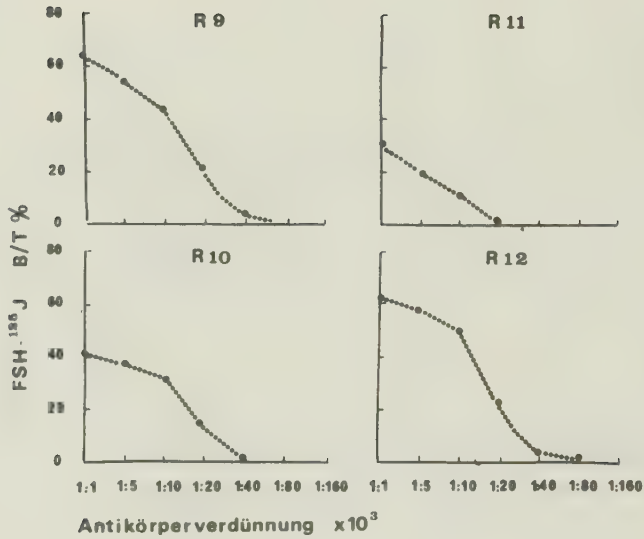


Abbildung 8

Titrationenkurven der FSH-β-Antiseren

(Endverdünnung x 3.4). B/T % = antikörpergebundener Anteil des Tracers FSH-¹²⁵J abzüglich der unspezifischen Fällung und der Leerimpulsrate des Gammazählers.

Totalaktivität des Tracers 10 000 cpm.

Inkubation 5 Tage.

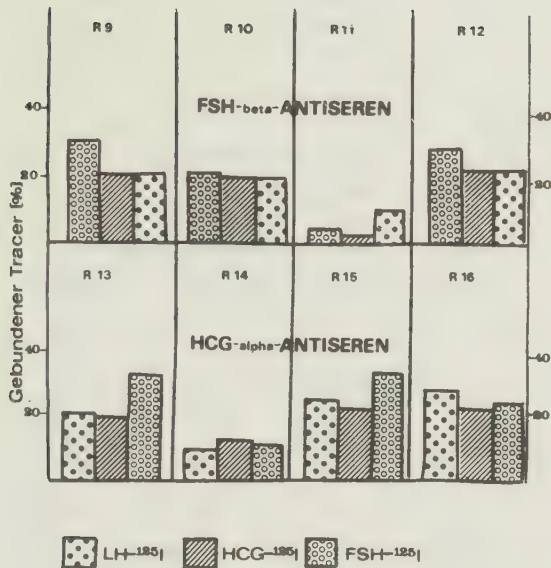


Abbildung 9

Bindungsanalysen der FSH- β -Antiseren und der HCG- α -Antiseren. Antikörperverdünnung 1 : 10 000 (Endverdünnung $\times 3.4$).

B/T % = antikörpergebundener Anteil der Tracer abzüglich der unspezifischen Fällung und der Leerimulsrate.

Totalaktivitäten der Tracer 10 000 cpm.

Inkubation 24 Stunden.

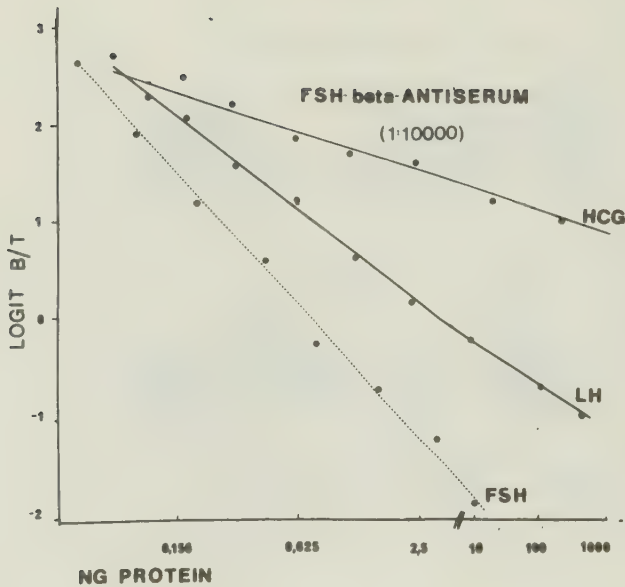


Abbildung 10

Inhibitionskurven von FSH, LH und HCG im
Radioimmunoassaysystem: FSH- β -Antiserum (R 9/12)
FSH - ^{125}J (vor Immunoabsorption). Computerausdruck
der Logit-Log Transformationen der Inhibitionskurven
Standardparameter: Totalaktivität: 7899 cpm.
unspezifische Fällung: 447 cpm.
Leerimpulsrate 120 cpm.
(B/T) -o : 0.319, Slope: -0.616.

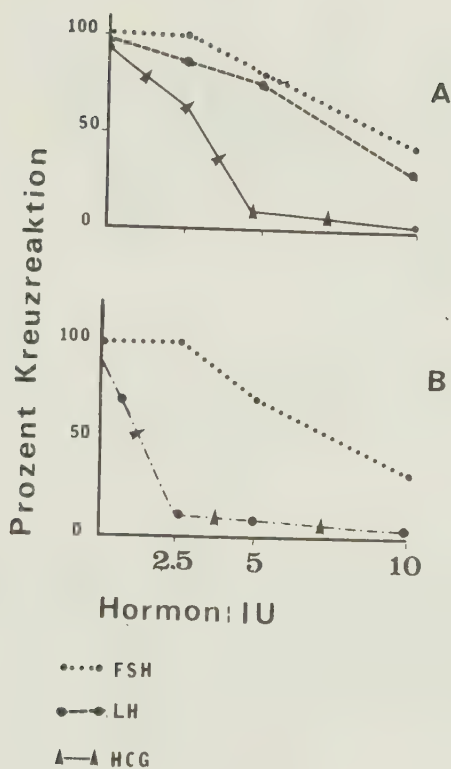


Abbildung 11:

Bindungsraten des FSH- β -Antiserums
(R 9/12) mit FSH- ^{125}J , LH- ^{125}J und
HCG- ^{125}J im Verhältnis zu den Absorbens-
konzentrationen von

A. 2.5, 5, 10 IU HCG

B. 2.5, 5, 10 IU LH.

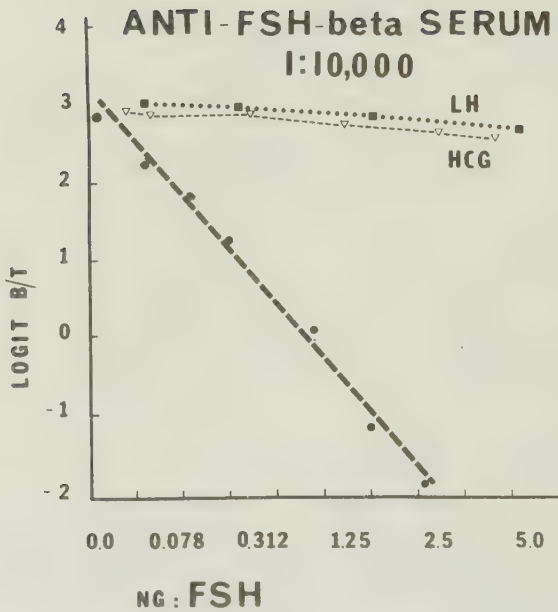


Abbildung 12:

Inhibitionskurven von FSH, LH und HCG im Radioimmunoassaysystem: FSH- β -Antiserum (R 9/12) - FSH- ^{125}J nach Immunoabsorption. Computerausdruck der Logit-Log Transformation der Dosiskurven. Standardparameter: Totalaktivität: 9363 cpm, unspezifische Fällung: 720 cpm, Leerimpulsrate: 192 cpm (B/T) -0 : 0.391. Slope: -.728.

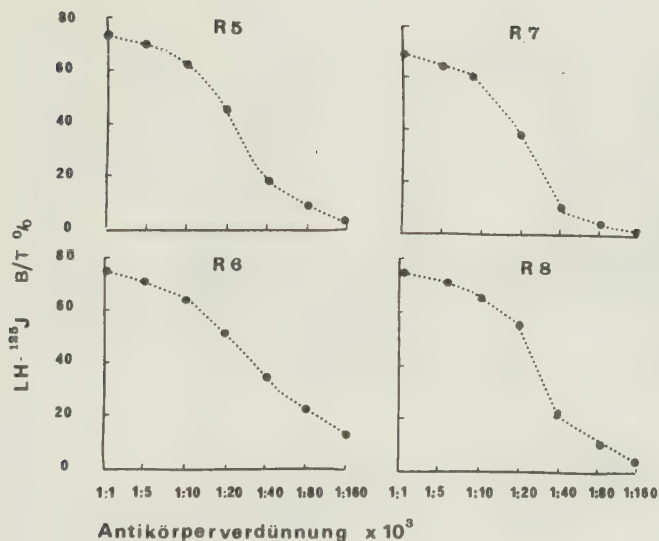


Abbildung 13:

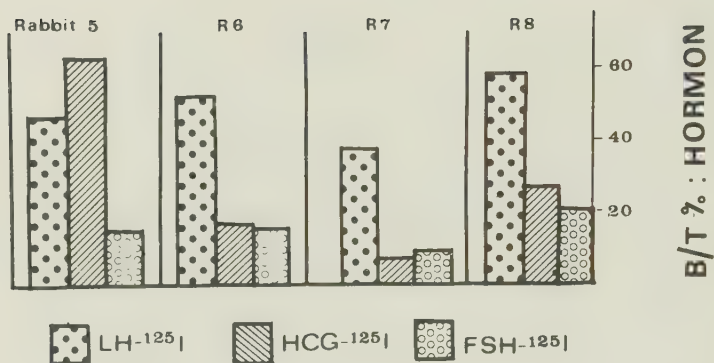
Titrationen der LH- β -Antiseren (Endverdünnung x 3.4).

B/T% / antikörpergebundener Anteil des Tracers

LH-¹²⁵J abzüglich der unspezifischen Fällung und der

Leerimpulsrate. Totalaktivität des Tracers 10 000 cpm.

Inkubation: 5 Tage.



BINDUNGSKAPAZITÄTEN DER LH-beta-ANTISEREN

Abbildung 14:

Bindungsanalysen der LH- β -Antiseren.

Antikörperverdünnung 1 : 10 000 (Endverdünnung $\times 3.4$).

B/T % = antikörpergebundener Anteil des Tracers abzüglich der unspezifischen Fällung und der Leerimpulsrate.

Totalaktivitäten der Tracer 10 000 cpm.

Inkubation 24 Stunden.

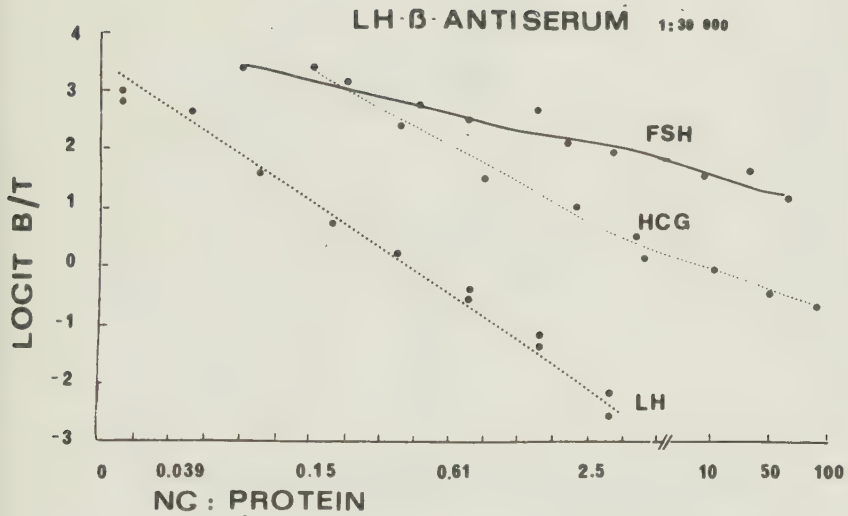


Abbildung 15:

Inhibitionskurven von LH, FSH und HCG im Radioimmunoassaysystem:
 LH- β -Antiserum (R_{Pool}) - LH- ^{125}J (vor Immunoabsorption).
 Computerausdruck der Logit-Log Transformationen der Inhibitions-
 kurven. Standardparameter der LH-Dosiskurve : Totalaktivität :
 10 008 cpm, unspezifische Fällung 508 cpm. Leerimpulsrate: 212 cpm,
 (B/T) -o : 0.40, Slope: -0.752.

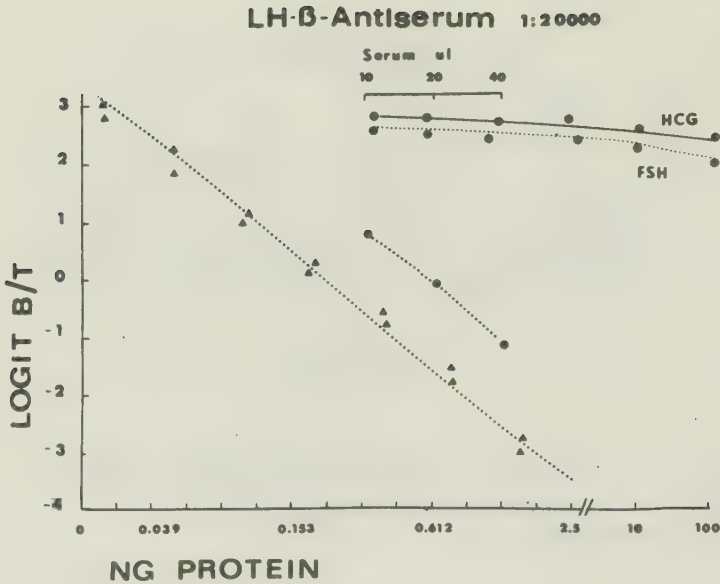


Abbildung 16:

Inhibitionskurven von LH, FSH und HCG im Radioimmunoassay-system: LH- β -Antiserum (R_{Pool}) - LH- ^{125}J (nach Immunoabsorption mit 100 μg HCG- α und 50 IU HCG). Computerausdruck der Logit-Log-Transformationen der Inhibitionskurven. Standardparameter der LH-Dosiskurve : Totalaktivität : 9785 cpm, unspezifische Fällung: 467 cpm, Leerimpulsrate: 213 cpm (B/T) -o : 0.385, Slope: -0.885.

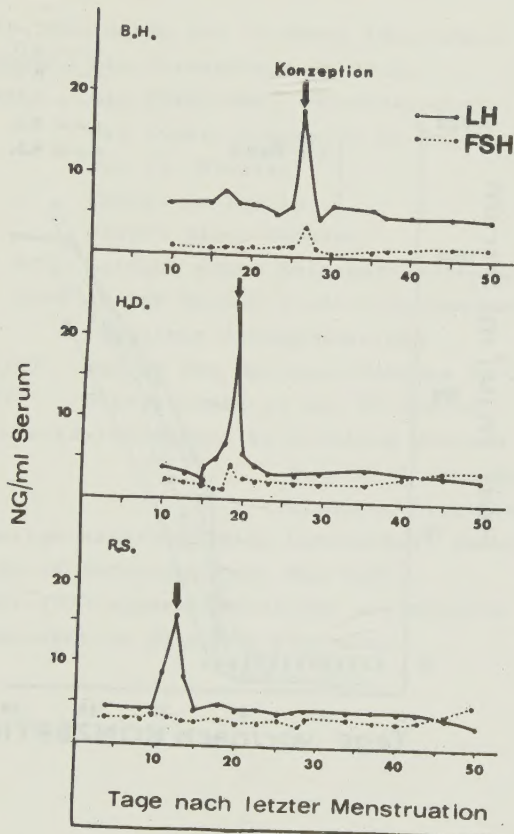


Abbildung 17:

LH- und FSH-Serumkonzentrationen im
Konzeptionszyklus

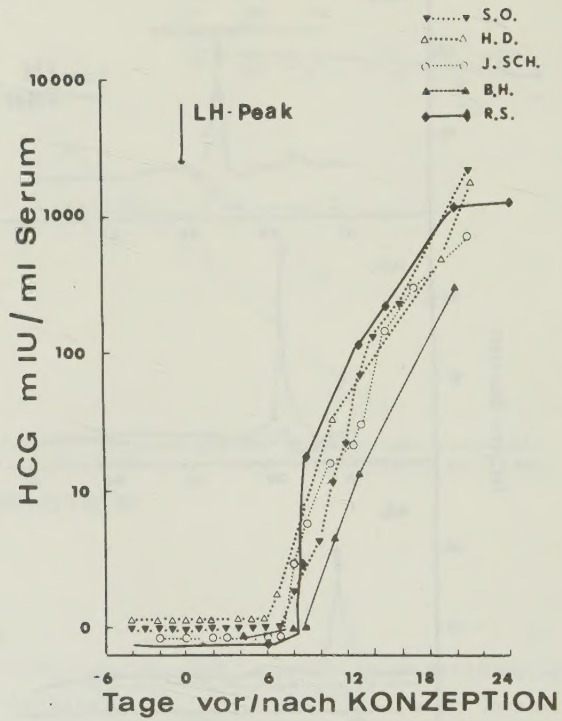


Abbildung 18:

HCG-Serumkonzentrationen vor und nach
Konzeption.

LEBENSLAUF

Am 15.10.1942 wurde ich in Gösen (Oberpfalz) geboren.

Ich besuchte die Volksschule in Floß,

die Städt.Mäd.-Oberrealschule in Weiden,

das Staatl.Gymnasium in Sulzbach-Rosenberg bis
zur 13. Klasse.

1963

Heirat in Berlin

Geburt einer Tochter

1964 - 1972 Leitung einer Reisebürovertretung

Frühjar 1966 Abitur an der P.-A.-Silbermann-Schule,
(Berliner Abendgymnasium)

WS 1966/67 Beginn des Medizin-Studiums an der FU Berlin

März 1973 Staatsexamen an der FU Berlin

Medizinalassistentenzeit im Klinikum Westend

Rudolf-Virchow-Krankenhaus

Klinikum Steglitz

Mehrmonatige experimentelle Laborarbeit im Labor Dr. Saxena
(Division of Endocrinology, New York).

Seit Juli 1974 wissenschaftliche Assistentin am Institut
für Pathologie im Klinikum Steglitz.

DANKSAGUNG

Ich danke herzlichst Herrn Professor Dr.B.B.Saxena und Herrn Professor Dr.J.Nevinny-Stickel für die überaus freundliche Beratung und Hilfe. Frl.Schmitt danke für das Sammeln der Serumproben.